

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FRI017/00	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 03016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999
Anmelder FRIZ BIOCHEM GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 4

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68 C07H21/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q C07H		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 199 01 761 A (HARTWICH GERHARD DR) 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument ---	1,22,34, 49,53
A	WO 98 20162 A (GOZIN MICHAEL ;YU CHANGJUN (US); KAYYEM JON F (US); CLINICAL MICRO) 14. Mai 1998 (1998-05-14) Patentansprüche ---	1,22
A	US 5 770 369 A (FRASER SCOTT E ET AL) 23. Juni 1998 (1998-06-23) Zusammenfassung --- -/--	1,22
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>*Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14. März 2001		23/03/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter de Nooy, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WILLNER I ET AL: "ASSEMBLY OF FUNCTIONALIZED MONOLAYERS OF REDOX PROTEINS ON ELECTRODE SURFACES: NOVEL BIOELECTRONIC AND OPTOBIOELECTRONIC SYSTEMS" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, Bd. 12, Nr. 4, 1997, Seiten 337-356, XP000874626 ISSN: 0956-5663 Zusammenfassung -----	1,6
P,X	WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14. Oktober 1999 (1999-10-14) Zusammenfassung -----	1
P,A	WO 00 31101 A (HARTWICH GERHARD ;HELLER ADAM (US)) 2. Juni 2000 (2000-06-02) das ganze Dokument -----	1,22,34, 49,53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/03016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19901761 A	01-07-1999	AU 2662700 A DE 19926457 A WO 0042217 A	01-08-2000 27-07-2000 20-07-2000
WO 9820162 A	14-05-1998	US 6096273 A US 6090933 A AU 5196798 A EP 0939762 A	01-08-2000 18-07-2000 29-05-1998 08-09-1999
US 5770369 A	23-06-1998	US 5824473 A US 5591578 A US 6071699 A US 5952172 A AU 6166296 A EP 0871642 A WO 9640712 A AU 703329 B AU 1215295 A CA 2178618 A EP 0733058 A JP 9506510 T WO 9515971 A US 5780234 A US 5705348 A US 6087100 A	20-10-1998 07-01-1997 06-06-2000 14-09-1999 30-12-1996 21-10-1998 19-12-1996 25-03-1999 27-06-1995 15-06-1995 25-09-1996 30-06-1997 15-06-1995 14-07-1998 06-01-1998 11-07-2000
WO 9951778 A	14-10-1999	AU 3550699 A EP 1068359 A	25-10-1999 17-01-2001
WO 0031101 A	02-06-2000	DE 19921940 A AU 1383600 A	15-06-2000 13-06-2000

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FRI017/00	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/ 03016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/09/1999
Anmelder FRIZ BIOCHEM GMBH et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 3 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 4

☒ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☐ keine der Abb.

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 C07H21/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q C07H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 199 01 761 A (HARTWICH GERHARD DR) 1. Juli 1999 (1999-07-01) das ganze Dokument ---	1,22,34, 49,53
A	WO 98 20162 A (GOZIN MICHAEL ;YU CHANGJUN (US); KAYYEM JON F (US); CLINICAL MICRO) 14. Mai 1998 (1998-05-14) Patentansprüche ---	1,22
A	US 5 770 369 A (FRASER SCOTT E ET AL) 23. Juni 1998 (1998-06-23) Zusammenfassung --- -/-	1,22



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/03/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

de Nooy, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WILLNER I ET AL: "ASSEMBLY OF FUNCTIONALIZED MONOLAYERS OF REDOX PROTEINS ON ELECTRODE SURFACES: NOVEL BIOELECTRONIC AND OPTOBIOELECTRONIC SYSTEMS" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS,GB,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, Bd. 12, Nr. 4, 1997, Seiten 337-356, XP000874626 ISSN: 0956-5663 Zusammenfassung	1,6
P,X	WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14. Oktober 1999 (1999-10-14) Zusammenfassung	1
P,A	WO 00 31101 A (HARTWICH GERHARD ;HELLER ADAM (US)) 2. Juni 2000 (2000-06-02) das ganze Dokument	1,22,34, 49,53

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/03016

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19901761 A	01-07-1999	AU 2662700 A DE 19926457 A WO 0042217 A	01-08-2000 27-07-2000 20-07-2000
WO 9820162 A	14-05-1998	US 6096273 A US 6090933 A AU 5196798 A EP 0939762 A	01-08-2000 18-07-2000 29-05-1998 08-09-1999
US 5770369 A	23-06-1998	US 5824473 A US 5591578 A US 6071699 A US 5952172 A AU 6166296 A EP 0871642 A WO 9640712 A AU 703329 B AU 1215295 A CA 2178618 A EP 0733058 A JP 9506510 T WO 9515971 A US 5780234 A US 5705348 A US 6087100 A	20-10-1998 07-01-1997 06-06-2000 14-09-1999 30-12-1996 21-10-1998 19-12-1996 25-03-1999 27-06-1995 15-06-1995 25-09-1996 30-06-1997 15-06-1995 14-07-1998 06-01-1998 11-07-2000
WO 9951778 A	14-10-1999	AU 3550699 A EP 1068359 A	25-10-1999 17-01-2001
WO 0031101 A	02-06-2000	DE 19921940 A AU 1383600 A	15-06-2000 13-06-2000

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/03016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 01 761 A (HARTWICH GERHARD DR) 1 July 1999 (1999-07-01) the whole document	1,22,34, 49,53
A	WO 98 20162 A (GOZIN MICHAEL ;YU CHANGJUN (US); KAYYEM JON F (US); CLINICAL MICRO) 14 May 1998 (1998-05-14) claims	1,22
A	US 5 770 369 A (FRASER SCOTT E ET AL) 23 June 1998 (1998-06-23) abstract	1,22
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2001

Date of mailing of the international search report

23/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

de Nooy, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/03016

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WILLNER I ET AL: "ASSEMBLY OF FUNCTIONALIZED MONOLAYERS OF REDOX PROTEINS ON ELECTRODE SURFACES: NOVEL BIOELECTRONIC AND OPTOBIOELECTRONIC SYSTEMS" BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, GB, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, vol. 12, no. 4, 1997, pages 337-356, XP000874626 ISSN: 0956-5663 abstract	1, 6
P, X	WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14 October 1999 (1999-10-14) abstract	1
P, A	WO 00 31101 A (HARTWICH GERHARD ;HELLER ADAM (US)) 2 June 2000 (2000-06-02) the whole document	1, 22, 34, 49, 53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/03016

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19901761 A	01-07-1999	AU 2662700 A	01-08-2000
		DE 19926457 A	27-07-2000
		WO 0042217 A	20-07-2000
WO 9820162 A	14-05-1998	US 6096273 A	01-08-2000
		US 6090933 A	18-07-2000
		AU 5196798 A	29-05-1998
		EP 0939762 A	08-09-1999
US 5770369 A	23-06-1998	US 5824473 A	20-10-1998
		US 5591578 A	07-01-1997
		US 6071699 A	06-06-2000
		US 5952172 A	14-09-1999
		AU 6166296 A	30-12-1996
		EP 0871642 A	21-10-1998
		WO 9640712 A	19-12-1996
		AU 703329 B	25-03-1999
		AU 1215295 A	27-06-1995
		CA 2178618 A	15-06-1995
		EP 0733058 A	25-09-1996
		JP 9506510 T	30-06-1997
		WO 9515971 A	15-06-1995
		US 5780234 A	14-07-1998
		US 5705348 A	06-01-1998
		US 6087100 A	11-07-2000
WO 9951778 A	14-10-1999	AU 3550699 A	25-10-1999
		EP 1068359 A	17-01-2001
WO 0031101 A	02-06-2000	DE 19921940 A	15-06-2000
		AU 1383600 A	13-06-2000

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

10/0691

TECH CENTER 1600/2900

JUN 20 2002

RECEIVED

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

7

Applicant's or agent's file reference FR1017/00	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE00/03016	International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	Priority date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant FRIZ BIOCHEM GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 65 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☒ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 14 January 2002 (14.01.2002)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/03016

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages _____, as originally filed,
pages _____, filed with the demand,
pages 1-53, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001),
pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
Nos. _____, as amended under Article 19,
Nos. _____, filed with the demand,
Nos. 1-29, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001),
Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig _____, as originally filed,
sheets/fig _____, filed with the demand,
sheets/fig 1/7-7/7, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001),
sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/03016

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Sheet 1/1 containing sequence protocols submitted with the letter of 14 December 2000 is not part of the application (PCT Rule 13ter.1(f)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/03016

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:

☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

See annex

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/DE 00/03016**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Box II.3.

The priority has been checked and found to be valid for the relevant parts of the application affected by the disclosures of documents WO-A-99/51778 (BARTON JACQUELINE; HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14 October 1999 (1999-10-14)) and WO-A-00/31101 (HARTWICH GERHARD; HELLER ADAM (US) 2 June 2000 (2000-06-02)). Said P-documents therefore do not belong to the relevant prior art for the examination of the present application with regard to novelty, inventive step and industrial applicability.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/03016**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-29	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-29	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. General

1.1 Reference is made to the following document:

D1: DE-A-199 01 761 (HARTWICH GERHARD DR) 1 July
1999 (1999-07-01).

1.2 The amendments to the description, the figures and the claims submitted with the letter of 3 December 2001 meet the requirements of PCT Article 34(2)(b).

2. Novelty

2.1 None of the documents cited in the international search report discloses a nucleic acid oligomer modified by being bonded to a natural or modified alcohol dehydrogenase, fructose dehydrogenase, lactate dehydrogenase or peroxidase. Claim 1 is therefore novel (PCT Article 33(2)). The same applies to dependent Claims 2-8 (PCT Article 33(2)). Claims 9-21 relate to the production or bonding of the modified nucleic acid oligomers defined in Claims 1-8 to an electroconductive surface, Claims 22-29 to a method for producing conductive

surfaces as per Claims 13-21 and the use thereof for electrochemical detection. Since these claims comprise the features of Claims 1-8, they are likewise novel (PCT Article 33(2)).

3. Inventive step

- 3.1 Document D1 discloses a method for the electrochemical detection of nucleic acid-oligomer hybridisation events (D1, title). The method disclosed in D1 uses DNA-/RNA-/PNA-oligomer single strands, one end of which is bonded to a conductive surface and the other, free end of which is linked to a photoinducible redox-active unit (D1, the abstract). The active principle of the method disclosed in D1 is explained in terms of photoindependent glucose oxidase. Glucose oxidase (GOx) is a redox-active enzyme consisting of an apoprotein and a flavin adenine dinucleotide cofactor (FAD). One end of a sample oligonucleotide is covalently bonded to an electrode and the other, still free end is functionalised with FAD, which is subsequently reconstituted with glucose oxidase apoprotein. The resultant surface hybrid of the general structure Elek-spacer-ss-oligo-spacer-FAD(GOx) has very little or no conductivity between the electrodes and the FAD. When hybridisation takes place using the target oligonucleotide complementary to "ss-oligo", conductivity is significantly increased (D1, page 14, lines 25-40). Furthermore, D1 discloses the use of light-absorbent substances, quinones, flavins, nicotine amides (D1, page 3, line 54 to page 4, line 1; page 4, lines 32-39; page 7, line 55) as electron, donor or acceptor molecules, and the use of modified nucleic

acid oligomers with a structurally similar backbone (D1, page 3, lines 32-36). The reactive group can be bonded via a free phosphorus group of the oligonucleotide backbone (D1, page 10, lines 35-47) or a thiol group of a modified base of the nucleic acid oligomer (D1, Claim 13). D1 also discloses the bonding of the reactive group via a branched or unbranched molecule part of any composition and chain length, it being possible for the shortest length of the chain to be 1-20 or 1-14 atoms (D1, Claims 3 and 4). The reactive group can be bonded to the oligomer at the phosphoric acid group on the free end (D1, page 10, line 37), it being possible to bond a plurality of reactive groups per oligomer (D1, Claim 1).

- 3.2 Document D1 is the prior art closest to Claim 1. Claim 1 differs from D1 by the enzyme used. The technical problem of interest is therefore that of developing an alternative redox-active unit. The solution disclosed in D1 consists in the use of alcohol dehydrogenase, fructose dehydrogenase, lactate dehydrogenase or a peroxidase. Although this solution is not explicitly disclosed, it cannot be considered to involve an inventive step (PCT Article 33(3)), since it is obvious to a person skilled in the art to replace one redox enzyme with another. This is particularly the case, since a person skilled in the art, given the general concept of D1, namely the simplified electron transfer by hybridising homologous strands, would not expect that said mechanism largely depends on the type of redox-active unit, and since a person skilled in the art, given said concept, would not expect any technical problem to arise from replacing one redox

enzyme with another. This is supported by the fact that D1 already discloses two types of redox-active unit, namely photoinducible and catalytically active redox units (D1, page 7, "bonding of a photoinducible redox-active unit..."; D1, page 14, lines 25-40). The fact that the stated enzymes use different cofactors, namely pyrrolo-quinoline-quinone (PQQ) and FAD, does not affect this conclusion, since in D1 PQQ is used as an alternative substance to ubiquinone (UQ) (D1, Figure 2; page 18, Example 3), and therefore it is clear that the type of cofactor has no significant effect on the concept disclosed in D1. Furthermore, the description of the present application contains nothing that points to a surprising technical effect (e.g. improved sensitivity) resulting from the use of PQQ, for example as a result of the planar structure thereof or the presence of three acid groups.

- 3.3 In the light of document D1 and the standard knowledge of a person skilled in the art, dependent Claims 2-8 do not appear to contain any features which, in combination with the features of the claim to which they refer, meet the requirements for inventive step (PCT Article 33(3)). The same applies to Claims 9-29, which relate to the production of the modified nucleic acid oligomers defined in Claims 1-8, the bonding thereof to an electroconductive surface, to a method for the production of conductive surfaces as defined in Claims 13-21, and to the use thereof for electrochemical detection.

4. Industrial applicability

- 4.1 Claims 1-29 of the present application relate to subject matter that appears to satisfy the criterion of industrial applicability (PCT Article 33(1) to (4)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/03016

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The term "modified" in relation to an alcohol dehydrogenase, fructose dehydrogenase, lactate dehydrogenase and peroxidase in Claim 1 is unclear (PCT Article 6), since the claim does not provide a definition of said term.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT



(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FRI017/00	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder FRIZ BIOCHEM GMBH et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).
Diese Anlagen umfassen insgesamt 65 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Leber, T Tel. Nr. +49 89 2399 7195 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-53 51 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-29 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1/1, eingereicht mit Schreiben vom 14.12.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
 - ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
 - ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).
3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:
- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
 - ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
 - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-29
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-29
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Bescheides

1. Mit Schreiben vom 14.12.2000 eingereichtes Blatt 1/1 mit Sequenzprotokollen ist nicht Bestandteil der Anmeldung (Regel 13ter.1 f) PCT).

Zu Punkt II

Priorität

1. Die Priorität wurde überprüft und für die relevanten Teile der Anmeldung, welche durch die Offenbarung der Dokumente WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14. Oktober 1999 (1999-10-14)) und WO 00 31101 A (HARTWICH GERHARD ;HELLER ADAM (US) 2. Juni 2000 (2000-06-02)), betroffen sind, für gültig befunden. Die genannten P-Dokumente gehören somit nicht zum relevanten Stand der Technik für die Prüfung vorliegender Anmeldung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Allgemeines

- 1.1 Es wird auf die folgendes Dokument verwiesen:

D1: DE 199 01 761 A (HARTWICH GERHARD DR) 1. Juli 1999 (1999-07-01)

- 1.2 Die mit dem Schreiben vom 03.12.2001 eingegangenen Änderungen der Beschreibung, Figuren und Ansprüche erfüllen die Bedingungen der Art 34(2)(b) PCT.

2. Neuheit

- 2.1 Keines der im internationalen Recherchenbericht genannten Dokumente offenbart ein Nukleinsäure-Oligomer, welches durch Anbindung einer nativen oder modifizierten Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase oder einer Peroxidase modifiziert ist. Somit ist der Anspruch 1 neu (Art 33(2) PCT). Gleiches gilt für die abhängigen Ansprüche 2-8 (Art 33(2) PCT). Die Ansprüche 9-21 beziehen sich auf die Herstellung bzw. Anbindung der in den Ansprüchen 1-8 definierten modifizierten Nukleinsäure-Oligomere an eine elektrisch leitfähige Oberfläche, die Ansprüche 22-29 auf Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Oberflächen gemäß den Ansprüchen 13-21 und deren Verwendung zur elektrochemischen Detektion. Da diese Ansprüche die Merkmale der Ansprüche 1-8 umfassen, sind diese ebenfalls neu (Art 33(2) PCT).

3. Erfinderische Tätigkeit

- 3.1 Dokument D1 offenbart Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen (D1, Titel). Den in D1 offenbarten Verfahren dienen DNA-/RNA-/PNA-Oligomer-Einzelstränge, die mit einem Ende an eine leitfähigen Oberfläche gebunden und am anderen, freien Ende mit einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit verknüpft sind (D1, Zusammenfassung). Das Wirkungsprinzip der in D1 offenbarten Methode wird anhand der photounabhängigen Glucoseoxidase erläutert. Die Glucoseoxidase (GOx) ist ein redoxaktives Enzym, das aus einem Apoprotein und einem Flavin-Adenin-Dinukleotid-Cofactor (FAD) besteht. Ein Probe-Oligonukleotid ist mit einem Ende kovalent an eine Elektrode gebundene und am anderen, noch freien Ende, mit FAD funktionalisiert welches anschließend mit Glucoseoxidase-Apoprotein rekonstituiert wird. Das entstandene Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-spacer-ss-oligo-spacer-FAD(GOx) weist zwischen Elektrode und FAD keine oder nur geringe Leitfähigkeit auf. Im Falle der Hybridisierung mit dem zu "ss-oligo" komplementären Target-Oligonukleotid wird die Leitfähigkeit deutlich erhöht (D1, Seite 14, Zeilen 25-40). Ferner offenbart D1 die Verwendung von lichtabsorbierenden Substanzen, Chinonen, Flavinen, Nikotinamiden (D1, Seite 3, Zeile 54 -Seite 4, Zeile 1; Seite 4, Zeilen 32-39; Seite 7, Zeile 55) als Elektronen- Donor- bzw. -Akzeptor-Moleküle und die Verwendung

von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren mit strukturell analogem Rückgrat (D1, Seite 3, Zeile 32-36). Die Anbindung der reaktiven Gruppe kann über eine freie Phosphorgruppe des Oligonukleotid Rückgrats (D1, Seite 10, Zeilen 35-47) bzw. einer Thiol-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers (D1, Anspruch 13) erfolgen. Ferner offenbart D1, die Anbindung der reaktiven Gruppe über einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge wobei die kürzeste Länge der Kette 1-20 bzw. 1-14 Atome sein kann (D1, Ansprüche 3 und 4). Die Bindung der reaktiven Gruppe an das Oligomer kann an die freie endständige Phosphorsäuregruppe erfolgen (D1, Seite 10, Zeile 37) und es können mehrere reaktive Gruppen pro Oligomer gebunden sein (D1, Anspruch 1).

- 3.2 Dokument D1 stellt für den Anspruch 1 den nächstliegenden Stand der Technik dar. Anspruch 1 unterscheidet sich von D1 durch das benutzte Enzym. Das technische Problem ist somit die Bereitstellung einer alternativen redoxaktiven Einheit. Die in Anspruch 1 offenbarte Lösung ist die Verwendung der Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase oder einer Peroxidase. Obwohl diese Lösung nicht explizit offenbart ist, kann ihr kein erfinderischer Schritt zuerkannt werden kann (Art 33(3) PCT), da es für den Fachmann offensichtlich ist ein Redoxenzym durch ein anderes zu ersetzen. Dies gilt insbesondere deshalb, weil der Fachmann aufgrund des in D1 dargestellten generellen Konzeptes, nämlich des erleichterten Elektronentransfers durch Hybridisierung homologer Stränge, nicht erwarten würde, daß besagter Mechanismus vom Typ der redoxaktiven Einheit wesentlich abhängt und weil der Fachmann aufgrund des besagten Konzeptes kein technisches Problem beim Ersatz eines Redoxenzymes durch ein anderes erwarten würde. Dies wird dadurch gestützt, daß D1 bereits zwei Typen an redoxaktiven Einheiten offenbart, nämlich photoinduzierbare und katalytisch aktive Redoxeinheiten (D1, Seite 7 "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit..."; D1, Seite 14, Zeilen 25-40). Die Tatsache, daß die genannten Enzyme unterschiedliche Cofaktoren verwenden, nämlich Pyrrolo-Chinoline- Chinon (PQQ) bzw. FAD, steht dieser Schlußfolgerung nicht entgegen, da in D1 PQQ als alternative Substanz zu Ubichinon (UQ) verwendet wird (D1, Fig. 2; Seite 18 Beispiel 3) und somit klar ist, daß der Typ des Cofaktors keinen wesentlichen Einfluß auf das in D1 offenbarte Konzept hat. Ferner ergeben sich aus der Beschreibung vorliegender Anmeldung

keinerlei Anhaltspunkte, die daraufhin deuten, daß sich ein überraschender technischer Effekt (z.B. verbesserte Empfindlichkeit) aus der Verwendung von PQQ, beispielsweise in Folge seiner planaren Struktur oder der Gegenwart dreier Säuregruppen, ergeben.

- 3.3 Im Lichte des Dokuments D1 und des Standardwissens des Fachmannes scheinen die abhängigen Ansprüche 2-8 keine Merkmale aufzuweisen, welche in Kombination mit den Merkmalen der Ansprüche, auf die sie verweisen, die Bedingungen für die Anerkennung einer erfinderischen Tätigkeit zu erfüllen (Art 33(3) PCT). Gleiches gilt für die Ansprüche 9-29 welche sich auf die Herstellung der in den Ansprüchen 1-8 definierten modifizierten Nukleinsäure-Oligomere, deren Anbindung an eine elektrisch leitfähige Oberfläche, auf Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Oberflächen wie sie in den Ansprüchen 13-21 definiert sind bzw. auf deren Verwendung zur elektrochemischen Detektion beziehen.

4. Gewerbliche Anwendbarkeit

- 4.1 Die Ansprüche 1-29 der vorliegenden Patentanmeldung beziehen sich auf einen Gegenstand der das Kriterium der gewerblichen Anwendbarkeit zu erfüllen scheint (Art 33(1)(4) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Ausdruck "modifiziert" im Bezug auf eine Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase und Peroxidase im Anspruch 1 ist unklar (Art 6 PCT), da eine Definition dieses Begriffes im besagen Anspruch fehlt.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 14 June 2001 (14.06.01)	
International application No. PCT/DE00/03016	Applicant's or agent's file reference FR1017/00
International filing date (day/month/year) 01 September 2000 (01.09.00)	Priority date (day/month/year) 22 September 1999 (22.09.99)
Applicant HARTWICH, Gerhard	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 02 February 2001 (02.02.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
 34, chemin des Colombettes
 1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Antonia Muller

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 17 JAN 2002

PCT

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

137

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts FRI017/00	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/03016	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 22/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder FRIZ BIOCHEM GMBH et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 65 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☒ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 02/02/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 14.01.2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Leber, T Tel. Nr. +49 89 2399 7195 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-53 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-29 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/7-7/7 eingegangen am 03/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

1/1, eingereicht mit Schreiben vom 14.12.2000.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☒ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

II. Priorität

1. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da folgende angeforderte Unterlagen nicht innerhalb der vorgeschriebenen Frist eingereicht wurden:
- ☐ Abschrift der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
 - ☐ Übersetzung der früheren Anmeldung, deren Priorität beansprucht worden ist.
2. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung der beanspruchten Priorität erstellt worden, da sich der Prioritätsanspruch als ungültig herausgestellt hat.

Für die Zwecke dieses Berichts gilt daher das obengenannte internationale Anmeldedatum als das maßgebliche Datum.

3. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
siehe Beiblatt

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-29
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-29
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-29
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt

Zu Punkt I

Grundlage des Bescheides

1. Mit Schreiben vom 14.12.2000 eingereichtes Blatt 1/1 mit Sequenzprotokollen ist nicht Bestandteil der Anmeldung (Regel 13ter.1 f) PCT).

Zu Punkt II

Priorität

1. Die Priorität wurde überprüft und für die relevanten Teile der Anmeldung, welche durch die Offenbarung der Dokumente WO 99 51778 A (BARTON JACQUELINE ;HILL MICHAEL (US); KELLEY SHANA (US); CALIFORNI) 14. Oktober 1999 (1999-10-14)) und WO 00 31101 A (HARTWICH GERHARD ;HELLER ADAM (US) 2. Juni 2000 (2000-06-02)), betroffen sind, für gültig befunden. Die genannten P-Dokumente gehören somit nicht zum relevanten Stand der Technik für die Prüfung vorliegender Anmeldung hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Regel 66.2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Allgemeines

- 1.1 Es wird auf die folgendes Dokument verwiesen:

D1: DE 199 01 761 A (HARTWICH GERHARD DR) 1. Juli 1999 (1999-07-01)

- 1.2 Die mit dem Schreiben vom 03.12.2001 eingegangenen Änderungen der Beschreibung, Figuren und Ansprüche erfüllen die Bedingungen der Art 34(2)(b) PCT.

2. Neuheit

- 2.1 Keines der im internationalen Recherchenbericht genannten Dokumente offenbart ein Nukleinsäure-Oligomer, welches durch Anbindung einer nativen oder modifizierten Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase oder einer Peroxidase modifiziert ist. Somit ist der Anspruch 1 neu (Art 33(2) PCT). Gleiches gilt für die abhängigen Ansprüche 2-8 (Art 33(2) PCT). Die Ansprüche 9-21 beziehen sich auf die Herstellung bzw. Anbindung der in den Ansprüchen 1-8 definierten modifizierten Nukleinsäure-Oligomere an eine elektrisch leitfähige Oberfläche, die Ansprüche 22-29 auf Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Oberflächen gemäß den Ansprüchen 13-21 und deren Verwendung zur elektrochemischen Detektion. Da diese Ansprüche die Merkmale der Ansprüche 1-8 umfassen, sind diese ebenfalls neu (Art 33(2) PCT).

3. Erfinderische Tätigkeit

- 3.1 Dokument D1 offenbart Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen (D1, Titel). Den in D1 offenbarten Verfahren dienen DNA-/RNA-/PNA-Oligomer-Einzelstränge, die mit einem Ende an eine leitfähigen Oberfläche gebunden und am anderen, freien Ende mit einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit verknüpft sind (D1, Zusammenfassung). Das Wirkungsprinzip der in D1 offenbarten Methode wird anhand der photounabhängigen Glucoseoxidase erläutert. Die Glucoseoxidase (GOx) ist ein redoxaktives Enzym, das aus einem Apoprotein und einem Flavin-Adenin-Dinukleotid-Cofactor (FAD) besteht. Ein Probe-Oligonukleotid ist mit einem Ende kovalent an eine Elektrode gebundene und am anderen, noch freien Ende, mit FAD funktionalisiert welches anschließend mit Glucoseoxidase-Apoprotein rekonstituiert wird. Das entstandene Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-spacer-ss-oligo-spacer-FAD(GOx) weist zwischen Elektrode und FAD keine oder nur geringe Leitfähigkeit auf. Im Falle der Hybridisierung mit dem zu "ss-oligo" komplementären Target-Oligonukleotid wird die Leitfähigkeit deutlich erhöht (D1, Seite 14, Zeilen 25-40). Ferner offenbart D1 die Verwendung von lichtabsorbierenden Substanzen, Chinonen, Flavinen, Nikotinamiden (D1, Seite 3, Zeile 54 -Seite 4, Zeile 1; Seite 4, Zeilen 32-39; Seite 7, Zeile 55) als Elektronen- Donor- bzw. -Akzeptor-Moleküle und die Verwendung

von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren mit strukturell analogem Rückgrat (D1, Seite 3, Zeile 32-36). Die Anbindung der reaktiven Gruppe kann über eine freie Phosphorgruppe des Oligonukleotid Rückgrats (D1, Seite 10, Zeilen 35-47) bzw. einer Thiol-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers (D1, Anspruch 13) erfolgen. Ferner offenbart D1, die Anbindung der reaktiven Gruppe über einen verzweigten oder unverzweigten Molekülteil beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge wobei die kürzeste Länge der Kette 1-20 bzw. 1-14 Atome sein kann (D1, Ansprüche 3 und 4). Die Bindung der reaktiven Gruppe an das Oligomer kann an die freie endständige Phosphorsäuregruppe erfolgen (D1, Seite 10, Zeile 37) und es können mehrere reaktive Gruppen pro Oligomer gebunden sein (D1, Anspruch 1).

- 3.2 Dokument D1 stellt für den Anspruch 1 den nächstliegenden Stand der Technik dar. Anspruch 1 unterscheidet sich von D1 durch das benutzte Enzym. Das technische Problem ist somit die Bereitstellung einer alternativen redoxaktiven Einheit. Die in Anspruch 1 offenbarte Lösung ist die Verwendung der Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase oder einer Peroxidase. Obwohl diese Lösung nicht explizit offenbart ist, kann ihr kein erfinderischer Schritt zuerkannt werden kann (Art 33(3) PCT), da es für den Fachmann offensichtlich ist ein Redoxenzym durch ein anderes zu ersetzen. Dies gilt insbesondere deshalb, weil der Fachmann aufgrund des in D1 dargestellten generellen Konzeptes, nämlich des erleichterten Elektronentransfers durch Hybridisierung homologer Stränge, nicht erwarten würde, daß besagter Mechanismus vom Typ der redoxaktiven Einheit wesentlich abhängt und weil der Fachmann aufgrund des besagten Konzeptes kein technisches Problem beim Ersatz eines Redoxenzymes durch ein anderes erwarten würde. Dies wird dadurch gestützt, daß D1 bereits zwei Typen an redoxaktiven Einheiten offenbart, nämlich photoinduzierbare und katalytisch aktive Redoxeinheiten (D1, Seite 7 "Bindung einer photoinduzierbar redoxaktiven Einheit..."; D1, Seite 14, Zeilen 25-40). Die Tatsache, daß die genannten Enzyme unterschiedliche Cofaktoren verwenden, nämlich Pyrrolo-Chinoline- Chinon (PQQ) bzw. FAD, steht dieser Schlußfolgerung nicht entgegen, da in D1 PQQ als alternative Substanz zu Ubichinon (UQ) verwendet wird (D1, Fig. 2; Seite 18 Beispiel 3) und somit klar ist, daß der Typ des Cofaktors keinen wesentlichen Einfluß auf das in D1 offenbarte Konzept hat. Ferner ergeben sich aus der Beschreibung vorliegender Anmeldung

keinerlei Anhaltspunkte, die daraufhin deuten, daß sich ein überraschender technischer Effekt (z.B. verbesserte Empfindlichkeit) aus der Verwendung von PQQ, beispielsweise in Folge seiner planaren Struktur oder der Gegenwart dreier Säuregruppen, ergeben.

- 3.3 Im Lichte des Dokuments D1 und des Standardwissens des Fachmannes scheinen die abhängigen Ansprüche 2-8 keine Merkmale aufzuweisen, welche in Kombination mit den Merkmalen der Ansprüche, auf die sie verweisen, die Bedingungen für die Anerkennung einer erfinderischen Tätigkeit zu erfüllen (Art 33(3) PCT). Gleiches gilt für die Ansprüche 9-29 welche sich auf die Herstellung der in den Ansprüchen 1-8 definierten modifizierten Nukleinsäure-Oligomere, deren Anbindung an eine elektrisch leitfähige Oberfläche, auf Verfahren zur Herstellung von leitfähigen Oberflächen wie sie in den Ansprüchen 13-21 definiert sind bzw. auf deren Verwendung zur elektrochemischen Detektion beziehen.

4. Gewerbliche Anwendbarkeit

- 4.1 Die Ansprüche 1-29 der vorliegenden Patentanmeldung beziehen sich auf einen Gegenstand der das Kriterium der gewerblichen Anwendbarkeit zu erfüllen scheint (Art 33(1)(4) PCT).

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Ausdruck "modifiziert" im Bezug auf eine Alkoholdehydrogenase, Fruktosedehydrogenase, Lactatdehydrogenase und Peroxidase im Anspruch 1 ist unklar (Art 6 PCT), da eine Definition dieses Begriffes im besagen Anspruch fehlt.

Elektrochemische Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen.

5

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft ein modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, sowie ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierungsereignissen.

10

Stand der Technik

Zur Sequenzanalyse von DNA und RNA, z. B. in der Krankheitsdiagnose, bei toxikologischen Testverfahren, in der genetischen Forschung und Entwicklung, sowie auf dem Agrar- und pharmazeutischen Sektor, werden im allgemeinen gel-elektrophoretische Verfahren mit autoradiographischer oder optischer Detektion verwendet.

Beim wichtigsten gel-elektrophoretischen Verfahren mit optischer Detektion, dem Sanger-Verfahren wird eine DNA enthaltende Lösung in vier Ansätze aufgeteilt. Zur Unterscheidung der vier Ansätze ist der Primer (komplementäre Startsequenz zur Replikation) jedes Ansatzes mit je einem bei verschiedener Wellenlänge emitierenden Fluoreszenzfarbstoff kovalent modifiziert. Ausgehend vom Primer wird jeder Ansatz durch DNA-Polymerase I enzymatisch repliziert. Neben den dazu nötigen Desoxyribonucleosid-Triphosphaten der Basen A (Adenin), T (Thymin), C (Cytosin), und G (Guanin) enthält jedes Reaktionsgemisch noch genügend 2',3'-Didesoxyanalogon eines dieser Nukleosidtriphosphate als Stopbase (je eine der 4 möglichen Stopbasen pro Ansatz), um die Replikation an allen möglichen Bindungsstellen zu stoppen. Nach Vereinigung der vier Ansätze entstehen replizierte DNA-Fragmente aller Längen mit stopbasenspezifischer Fluoreszenz, die gel-elektrophoretisch der Länge nach sortiert und durch Fluoreszenz-Spektroskopie charakterisiert werden können.

Ein anderes optisches Detektionsverfahren basiert auf der Anlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen wie z. B. Ethidiumbromid an Oligonukleotide. Im Vergleich zur freien Lösung des Farbstoffs ändert sich die Fluoreszenz solcher Farbstoffe bei Assoziation mit doppelsträngiger DNA oder RNA drastisch und kann deshalb zum Nachweis hybridisierter DNA oder RNA verwendet werden.

Bei der radioaktiven Markierung wird ^{32}P in das Phosphatgerüst der Oligonukleotide eingebaut, wobei ^{32}P gewöhnlich am 5'-Hydroxylende durch Polynukleotid-Kinase addiert wird. Die markierte DNA wird anschließend an jeweils einem der vier Nukleotidtypen bevorzugt gespalten und zwar unter definierten Bedingungen, so dass pro Kette durchschnittlich eine Spaltung erfolgt. Damit liegen im Reaktionsgemisch für einen bestimmten Basentyp Ketten vor, die sich von der ^{32}P -Markierung bis zur Position dieser Base erstrecken (bei mehrfachem Auftreten der Base erhält man entsprechend Ketten unterschiedlicher Länge). Die vier Fragmentgemische werden anschließend auf vier Bahnen gel-elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wird vom Gel ein Autoradiogramm angefertigt, an dem die Sequenz unmittelbar abgelesen werden kann.

Vor einigen Jahren wurde ein weiteres, auf optischer (oder autoradiographischer) Detektion beruhendes Verfahren zur DNA-Sequenzierung entwickelt, nämlich die Sequenzierung durch Oligomer-Hybridisierung (vgl. z. B. Drmanac et al., Genomics 4, (1989), S. 114-128 oder Bains et al., Theor. Biol. 135, (1988), S. 303-307). Bei diesem Verfahren wird ein vollständiger Satz kurzer Oligonukleotide bzw. Nukleinsäure-Oligomere (Sonden-Oligonukleotide), z. B. alle 65536 möglichen Kombinationen der Basen A, T, C und G eines Oligonukleotid-Oktamers auf ein Trägermaterial gebunden. Die Anbindung geschieht in einem geordneten Raster aus 65536 Test-Sites, wobei jeweils eine größere Menge einer Oligonukleotid-Kombination ein Test-Site definieren und die Position jeder einzelnen Test-Site (Oligonukleotid-Kombination) bekannt ist. Auf solch einer Hybridisierungsmatrix, dem Oligomer-Chip, wird ein DNA-Fragment, dessen Sequenz man ermitteln will (das Target), mit Fluoreszenzfarbstoff (oder ^{32}P) markiert und unter Bedingungen, die nur eine spezifische Doppelstrangbildung erlauben, hybridisiert. Dadurch bindet das Target DNA-Fragment nur an die Nukleinsäure-Oligomere (im Beispiel an die Oktamere), deren komplementäre Sequenz exakt einem Teil (einem Oktamer) seiner eigenen Sequenz entspricht. Durch optische (oder autoradiographische) Detektion der Bindungsposition des hybridisierten DNA-Fragments werden damit alle im Fragment vorhandenen Nukleinsäure-Oligomersequenzen (Oktamersequenzen) bestimmt. Aufgrund der Überlappung benachbarter Nukleinsäure-Oligomersequenzen kann durch geeignete mathematische Algorithmen die fortlaufende Sequenz des DNA-Fragments bestimmt werden. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen unter anderem in der Miniaturisierung der Sequenzierung und damit in der enormen Datenmenge, die gleichzeitig in einem Arbeitsgang erfaßt wird. Daneben kann auf Primer und auf das gel-elektrophoretische Auftrennen der DNA-Fragmente verzichtet werden. Beispielhaft ist dieses Prinzip in Figur 1 für ein 13 Basen langes DNA-Fragment gezeigt.

Neben der sogenannten de-novo Sequenzierung bisher unbekannter Oligonukleotid-Sequenzen können auf dem oben beschriebenen Oligomer-Chip auch Oligonukleotid-Sequenzen bzw. DNA-Fragmente gebunden werden, die ein oder mehrere bekannte Gene kodieren. So kann z. B. für jedes gesuchte Gen bekannter Basensequenz eine ausreichende Anzahl von Oligonukleotid-Sequenzen aus z. B. je 20 Basen, die zu entsprechenden Sequenzabschnitten des gesuchten Gens mit bekannter Basensequenz komplementär sind, auf einem Trägermaterial aufgebracht werden, um dieses Gen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit nachzuweisen. Andererseits können auf einem Oligomer-Chip auch bekannte Gene auf Mutationen hin geprüft werden, indem z. B. die entsprechenden Sequenzabschnitte der Gene mit und ohne Mutation auf dem Trägermaterial aufgebracht werden.

Die Verwendung radioaktiver Markierungen bei der DNA-/RNA-Sequenzierung ist mit mehreren Nachteilen verbunden, wie z. B. aufwendige, gesetzlich vorgeschriebene Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit radioaktiven Materialien, die Strahlenbelastung, das begrenzte räumliche Auflösungsvermögen (maximal 1mm²) und eine Sensitivität, die nur dann hoch ist, wenn die Strahlung der radioaktiven Fragmente entsprechend lange (Stunden bis Tage) auf einen Röntgenfilm einwirkt. Es kann zwar die räumliche Auflösung durch zusätzliche Hard- und Software erhöht und die Detektionszeit durch die Verwendung von β -Scannern verkürzt werden, beides ist jedoch mit erheblichen zusätzlichen Kosten verbunden.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die üblicherweise zur Markierung der DNA verwendet werden, sind zum Teil (z. B. Ethidiumbromid) mutagen und erfordern, ebenso wie die Anwendung der Autoradiographie, entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. In fast allen Fällen erfordert die Verwendung optischer Detektion den Gebrauch von einem oder mehreren Lasersystemen und somit geschultes Personal und entsprechende Sicherheitsvorkehrungen. Die eigentliche Detektion der Fluoreszenz erfordert zusätzliche Hardware, wie z. B. optische Bauelemente zur Verstärkung und, bei verschiedenen Anregungs- und Abfragewellenlängen wie im Sanger-Verfahren, ein Kontrollsystem. Abhängig von den benötigten Anregungswellenlängen und der gewünschten Detektionsleistung können somit erhebliche Investitionskosten entstehen. Bei der Sequenzierung durch Hybridisierung auf dem Oligomer-Chip ist die Detektion noch (kosten)aufwendiger, da, neben dem Anregungssystem, zur 2-dimensionalen Detektion der Fluoreszenzspots hochauflösende CCD-Kameras (Charge Coupled Device Kameras) benötigt werden.

In der DE 199 01 761 wird ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von sequenzspezifischen Nukleinsäureoligomerhybridisierungsereignissen beschrieben, bei

dem der Unterschied der Leitfähigkeit von Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomer und Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer das entscheidende Kriterium für die Detektion eines Hybridisierungsereignisses darstellt. Bei geeigneter Anordnung des Nukleinsäure-Oligomers als Teil einer elektrochemischen Zelle kann der Leitfähigkeitsunterschied als

5 "molekularer Schalter" innerhalb eines ansonsten geschlossenen Stromkreises verwendet werden. Im nicht-hybridisierten Zustand (als Einzelstrang) fungiert das Nukleinsäure-Oligomer als offener Schalter, bei Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang ist der Schalter geschlossen.

10 Gemäß DE 199 01 761 sind die Sonden-Oligonukleotide der einzelnen Test-Sites (dots mit Sonden-Oligonukleotiden identischer Sequenz) auf einer Elektrode immobilisiert, am freien Ende der Sonden-Oligonukleotide wird eine "Redox-Einheit" als Elektromarkierung kovalent an die Sonden-Oligonukleotide gebunden.

15 Die Redox-Einheit (Elektromarkierung), ein Komplex aus Elektron-Donor "D" und Elektron-Akzeptor "A" wird extern durch Licht zur Ladungstrennung angeregt. Dabei wird ein Elektron vom Donor auf den Akzeptor übertragen und es entsteht ein ladungsgetrennter Zustand D^+A^- . Die Leitfähigkeit des hybridisierten Sonden-Oligonukleotids ist hoch, d.h. ein Elektron kann, bei geeignetem Elektrodenpotential,

20 von A^- auf die Elektrode übertragen und detektiert werden. Bei Gegenwart eines löslichen Reduktionsmittels X^- , das D^+ zu D reduziert, wird die Redox-Einheit in den Zustand vor Lichtabsorption versetzt. Weitere Lichtabsorption startet den Zyklus erneut und erzeugt einen deutlichen Strom. Die Leitfähigkeit des Sonden-Oligonukleotids ohne komplementäres Target ist dagegen gering, das Elektron kann nicht von A^- auf die

25 Elektrode übertragen werden, der Zyklus ist unterbrochen, es fließt kein Strom.

Obwohl es also quantitative und extrem sensitive Methoden zur DNA-/RNA-Sequenzierung gibt, sind diese Methoden zeitaufwendig, bedingen aufwendige Probenpräparation und teure Ausstattung und sind im allgemeinen nicht als

30 transportable Systeme verfügbar.

35

Darstellung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es deshalb, eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden zu schaffen, welche die Nachteile des Standes der Technik nicht aufweisen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer gemäß unabhängigem Patentanspruch 1 gelöst.

- 5 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden die folgenden Abkürzungen und Begriffe benutzt:

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
PNA	Peptidnukleinsäure (synthetische DNA oder RNA, bei der die Zucker-Phosphat Einheit durch eine Aminosäure ersetzt ist. Bei Ersatz der Zucker-Phosphat Einheit durch die $-NH-(CH_2)_2-N(COCH_2\text{-Base})-CH_2CO\text{-}$ Einheit hybridisiert PNA mit DNA.)
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil
Base	A, G, T, C oder U
Bp	Basenpaar
Nukleinsäure	wenigstens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin). Der Begriff Nukleinsäure bezieht sich auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Strukturen (z. B. Phosphoramid-, Thio-Phosphat- oder Dithio-Phosphat-Rückgrat). Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann.
Nukleinsäure-Oligomer	Nukleinsäure nicht näher spezifizierter Basenlänge (z. B. Nukleinsäure-Oktamer: eine Nukleinsäure mit beliebigem Rückgrat, bei dem 8 Pyrimidin- oder Purin-Basen kovalent

	aneinander gebunden sind).
Oligomer	Äquivalent zu Nukleinsäure-Oligomer.
Oligonukleotid	Äquivalent zu Oligomer oder Nukleinsäure-Oligomer, also z. B. ein DNA, PNA oder RNA Fragment nicht näher spezifizierter Basenlänge.
Oligo	Abkürzung für Oligonukleotid.
Primer	Start-Komplementär-Fragment eines Oligonukleotids, wobei die Basenlänge des Primers nur ca. 4-8 Basen beträgt. Dient als Ansatzpunkt für die enzymatische Replikation des Oligonukleotids.
Mismatch	Zur Ausbildung der Watson Crick Struktur doppelsträngiger Oligonukleotide hybridisieren die beiden Einzelstränge derart, dass die Base A (bzw. C) des einen Strangs mit der Base T (bzw. G) des anderen Strangs Wasserstoffbrücken ausbildet (bei RNA ist T durch Uracil ersetzt). Jede andere Basenpaarung bildet keine Wasserstoffbrücken aus, verzerrt die Struktur und wird als „Mismatch“ bezeichnet.
ss	single strand (Einzelstrang)
ds	double strand (Doppelstrang)
redoxaktive Einheit	entspricht einer katalytisch redoxaktiven Einheit
katalytisch redoxaktive Einheit	eine im Rahmen der vorliegenden Erfindung unter dem Oberbegriff "katalytisch redoxaktive Einheit" bezeichnete Einheit besteht in der Regel aus einem oder mehreren redoxaktiven Zentren (Cofaktoren, prosthetischen Gruppen), die im folgenden als Elektron-Donoren bzw. Elektron Akzeptoren bezeichnet werden, und einem oder mehreren diese redoxaktiven Zentren bindenden Makromolekülen. Die katalytisch redoxaktive Einheit enthält also in ihrer erfindungsrelevanten Erscheinungsform ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle und/oder ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Molekülen, wobei dieses (diese) Elektron-Donor-Molekül(e) und/oder dieses (diese) Elektron-Akzeptor-Molekül(e) an ein oder mehrere Makromoleküle gebunden ist/wird bzw. in diese(s) Makromolekül(e) eingebettet ist. Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) können untereinander durch eine oder mehrere kovalente oder

ionische Bindungen, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, durch π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeption miteinander verbunden sein, wobei kovalente Verbindungen direkte oder indirekte (z. B. über einen Spacer, nicht aber über ein Nukleinsäure-Oligomer) Verbindungen sein können. Daneben können die Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) mit dem (den) Makromolekül(en) durch kovalente Anbindung an das (die) Makromolekül(e), durch Einkapseln in passende molekulare Kavitäten (Bindungstaschen) des Makromoleküls (der Makromoleküle), durch ionische Bindungen, Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeption zwischen dem(n) Makromolekül(en) und dem(n) Elektron-Donor-Molekül(en) und/oder dem(n) Elektron-Akzeptor-Molekül(en) verbunden sein. Sind mehrere Makromoleküle Bestandteil der katalytisch redoxaktiven Einheit kann die Bindung der Makromoleküle untereinander ebenfalls kovalent, ionisch, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeption erfolgen. Eine katalytisch redoxaktive Einheit kann im Minimalfall auch nur aus einem Makromolekül bestehen, wobei das Makromolekül dann in seiner erfindungsrelevanten Erscheinungsform auch als Elektron-Donor bzw. -Akzeptor wirkt. Sie kann auch nur aus einem Elektron-Donor bzw. -Akzeptor bestehen. Daneben kann die katalytisch redoxaktive Einheit auch durch spontane Zusammenlagerung der Bestandteile in Lösung (in situ) gebildet werden. Wesentliche Merkmale der katalytisch redoxaktiven Einheit sind neben der Zusammensetzung aus Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en): (i) die Einheit ist in den erfindungsrelevanten Erscheinungsformen (Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) im ursprünglichen bzw. oxidierten oder reduzierten Zustand) stabil und dissoziiert nicht in ihre Bestandteile, (ii) die elektrokatalytische Aktivität der Einheit (siehe unten), (iii) die Einheit enthält keine

	<p>Nukleinsäure, (iv) die Zusammensetzung der Einheit aus Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) und/oder Makromolekül(en) kann - unabhängig von der Bindung zwischen den Bestandteilen - vom Fachmann erkannt werden, da die redoxaktiven Zentren (Cofaktoren, prosthetischen Gruppen) und die zugehörige Matrix aus Makromolekül(en) (z. B. das Apoprotein bei Enzymen als Beispiel einer katalytisch redoxaktiven Einheit) prinzipiell auch getrennt voneinander vorkommen können. Die katalytisch redoxaktive Einheit kann z. B. jedes beliebige redoxaktive Protein/Enzym aus der Gruppe der Oxidasen bzw. der Reduktasen, durch Proteinengineering oder Genmutation veränderte Proteine/Enzyme aus dieser Gruppe der Oxidasen bzw. Reduktasen oder eine künstlich hergestellte Einheit aus einem oder mehreren redoxaktiven Zentren (Elektron-Donor bzw. Akzeptor) bzw. eine künstlich hergestellte Einheit aus einem oder mehreren redoxaktiven Zentren (Elektron-Donor bzw. Akzeptor) und einem oder mehreren diese redoxaktiven Zentren bindenden Makromolekülen sein.</p>
Cofaktor	entspricht einem redoxaktiven Zentrum (Elektron-Donor bzw. Akzeptor) der katalytisch redoxaktiven Einheit
prosthetische Gruppe	entspricht einem redoxaktiven Zentrum (Elektron-Donor bzw. Akzeptor) der katalytisch redoxaktiven Einheit
redoxaktives Zentrum der katalytisch redoxaktiven Einheit	<p>das redoxaktive Zentrum der katalytisch redoxaktiven Einheit zeichnet sich dadurch aus, dass es gegenüber einem für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifischen Substrat als Elektron-Donor bzw. -Akzeptor wirkt. Besitzt eine katalytisch redoxaktive Einheit mehrere redoxaktive Zentren (Elektron-Donoren und/oder Elektron-Akzeptoren) kann es zudem zu einer Ladungsübertragung innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit kommen: Nach dem Ladungstransfer zwischen dem für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifischen Substrat und einem ersten redoxaktiven Zentrum ist ein weiterer Ladungstransfer zwischen diesem ersten redoxaktiven Zentrum und einem weiteren redoxaktiven Zentrum derselben katalytisch redoxaktiven Einheit möglich, wobei dieses zweite redoxaktive Zentrum wiederum Ladung auf ein drittes redoxaktives Zentrum transferieren kann usw..</p>

	Innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit kann es also zu einem sukzessiven Ladungstransfer kommen, wenn die katalytisch redoxaktiven Einheit mehrere redoxaktive Zentren enthält. Dabei wird der Prozess der sukzessiven Ladungstransfers durch die Gegenwart des für die katalytisch redoxaktiven Einheit spezifischen Substrats (mit seiner Eigenschaft spontan eine Ladung zwischen Substrat und katalytisch redoxaktiver Einheit zu transferieren) initiiert.
Elektron-Donor-Molekül	entspricht einem Elektron-Donor.
Elektron-Akzeptor-Molekül	entspricht einem Elektron-Akzeptor.
Elektron-Donor	Der Begriff Elektron-Donor bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung einen Bestandteil der katalytisch redoxaktiven Einheit. Bei einem Elektron-Donor handelt es sich um ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron an einen Elektron-Akzeptor transferieren kann. Ein solcher äußerer Umstand ist z. B. die Oxidation oder Reduktion des Elektron-Donors oder -Akzeptors der katalytisch redoxaktiven Einheit durch ein externes Oxidations- oder Reduktionsmittel, also z. B. die Übertragung eines Elektrons auf den Elektron-Donor durch ein Reduktionsmittel bzw. die Abgabe eines Elektrons durch den Elektron-Akzeptor an ein Oxidationsmittel sein. Diese Oxidations- bzw. Reduktionsmittel können externe redoxaktive Substanzen sein, d. h. sie sind nicht kovalent mit der katalytisch redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbunden, stehen aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt, wobei insbesondere die für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifischen Substrate als externe Oxidations- oder Reduktionsmittel wirken können. Daneben kann ein externes Oxidations- oder Reduktionsmittel auch kovalent mit dem Nukleinsäure-Oligomer verbunden sein, wobei das Oxidations- bzw. Reduktionsmittel an einer Stelle des Nukleinsäure-Oligomers kovalent angebunden ist, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder

wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der redoxaktiven Einheit entfernt ist, bevorzugt an dem der Modifikation mit katalytisch redoxaktiver Einheit entgegengesetzten Ende des Oligonukleotids in der Nähe der leitfähigen Oberfläche. Insbesondere kann auch die leitfähige Oberfläche (Elektrode) als externes Oxidations- bzw. Reduktionsmittel wirken. Die Fähigkeit als Elektron-Donor oder -Akzeptor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül als Elektron-Donor wirkt, kann gegenüber diesem Molekül unter abweichenden experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül unter gleichen oder abweichenden experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Akzeptor wirken.

Elektron-Akzeptor

Der Begriff Elektron-Akzeptor bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung einen Bestandteil einer katalytisch redoxaktiven Einheit. Bei einem Elektron-Akzeptor handelt es sich um ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände ein Elektron von einem Elektron-Donor aufnehmen kann. Ein solcher äußerer Umstand ist z. B. die Oxidation oder Reduktion des Elektron-Donors oder -Akzeptors der katalytisch redoxaktiven Einheit durch ein externes Oxidations- oder Reduktionsmittel sein, also z. B. die Übertragung eines Elektrons auf den Elektron-Donor durch ein Reduktionsmittel bzw. die Abgabe eines Elektrons durch den Elektron-Akzeptor an ein Oxidationsmittel sein. Diese Oxidations- bzw. Reduktionsmittel können externe redoxaktive Substanzen sein, d. h. sie sind nicht kovalent mit der katalytisch redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbunden, stehen aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt, wobei insbesondere die für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifischen Substrate als externe Oxidations- oder Reduktionsmittel wirken können. Daneben kann ein externes Oxidations- oder Reduktionsmittel auch kovalent mit dem Nukleinsäure-Oligomer verbunden sein, wobei das Oxidations- bzw. Reduktionsmittel an einer Stelle des

Nukleinsäure-Oligomers kovalent angebunden ist, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der katalytisch redoxaktiven Einheit entfernt ist, bevorzugt an dem der Modifikation mit redoxaktiver Einheit entgegengesetzten Ende des Oligonukleotids in der Nähe der leitfähigen Oberfläche. Insbesondere kann auch die leitfähige Oberfläche (Elektrode) als externes Oxidations- bzw. Reduktionsmittel wirken. Die Fähigkeit als Elektron-Akzeptor oder -Donor zu wirken ist relativ, d. h. ein Molekül, das unmittelbar oder nach Einwirkung bestimmter äußerer Umstände gegenüber einem anderen Molekül als Elektron-Akzeptor wirkt, kann gegenüber diesem Molekül unter abweichenden experimentellen Bedingungen oder gegenüber einem dritten Molekül unter gleichen oder abweichenden experimentellen Bedingungen auch als Elektron-Donor wirken.

Oxidationsmittel

chemische Verbindung (chemische Substanz), die durch Aufnahme von Elektronen aus einer anderen chemischen Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) diese andere chemische Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) oxidiert. Ein Oxidationsmittel verhält sich analog zu einem Elektron-Akzeptor, wird aber im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Begriff für einen externen, nicht unmittelbar zur katalytisch redoxaktiven Einheit gehörigen Elektron-Akzeptor verwendet. Nicht unmittelbar bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Oxidationsmittel entweder ein für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifisches Substrat ist oder eine freie redoxaktive Substanz, die nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, aber mit diesem in Kontakt steht. Daneben kann das Oxidationsmittel kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden sein, jedoch an einer Stelle des Nukleinsäure-Oligomers, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der katalytisch redoxaktiven Einheit entfernt ist. Insbesondere kann auch die Elektrode das Oxidationsmittel darstellen.

Reduktionsmittel	chemische Verbindung (chemische Substanz), die durch Abgabe von Elektronen an eine andere chemische Verbindung (chemische Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) diese andere chemische Verbindung (chemischen Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) reduziert. Ein Reduktionsmittel verhält sich analog zu einem Elektron-Donor, wird aber im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Begriff für einen externen, nicht unmittelbar zur katalytisch redoxaktiven Einheit gehörigen Elektron-Donor verwendet. Nicht unmittelbar bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Reduktionsmittel entweder ein für die katalytisch redoxaktive Einheit spezifisches Substrat ist oder eine freie redoxaktive Substanz, die nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, aber mit diesem in Kontakt steht oder dass das Reduktionsmittel kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden ist, jedoch an einer Stelle des Nukleinsäure-Oligomers, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der redoxaktiven Einheit entfernt ist. Insbesondere kann auch die Elektrode das Reduktionsmittel darstellen.
redoxaktiv	redoxaktiv bezeichnet die Eigenschaft einer redoxaktiven Einheit unter bestimmten äußeren Umständen an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen bzw. die Eigenschaft einer redoxaktiven Substanz unter bestimmten äußeren Umständen an einen geeigneten Elektron-Akzeptor Elektronen abzugeben oder von einem geeigneten Elektron-Donor Elektronen aufzunehmen.
Analyt	entspricht einem Substrat
Substrat	freies, nicht kovalent mit der katalytisch redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbundenes, aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt stehendes Oxidations- oder Reduktionsmittel, wobei das Substrat z. B. ein geladenes oder ungeladenes Molekül, ein beliebiges Salz, ein Ion oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxidoreduktase) sein kann. Das Substrat ist dadurch

	<p>gekennzeichnet, dass es von der katalytisch redoxaktiven Einheit durch die Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Substrat und katalytisch redoxaktiver Einheit erkannt wird und den Donor (bzw. den Akzeptor) der katalytisch redoxaktiven Einheit reduzieren (bzw. oxidieren) kann, wobei die katalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit diese Redoxreaktion des Substrats zum Produkt beschleunigt (katalysiert).</p>
katalytische Aktivität	<p>die katalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit wirkt sich beschleunigend auf die spezifische Reaktion zwischen der Einheit und dem zugehörigen Substrat aus und ermöglicht so einen Reaktionsablauf, der ohne die katalytische Aktivität der Einheit nicht bzw. nur in nicht wahrnehmbarem Umfang stattfindet. Diese katalytische Aktivität der redoxaktiven Einheit wird durch Stabilisierung des jeweiligen Übergangszustands, d.h. der energiereichsten Spezies, im Reaktionsablauf zwischen katalytisch redoxaktiver Einheit und zugehörigem Substrat erreicht.</p>
elektrokatalytische Aktivität	<p>die elektrokatalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit steht in engem Bezug zur katalytischen Aktivität der Einheit. Durch die Anwesenheit der katalytisch redoxaktiven Einheit und deren Einbindung in den Reaktionsablauf der Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt (Ablauf der Gesamtreaktion der elektrochemischen Redoxreaktion zwischen einer Elektrode und dem Substrat, d.h. Abgabe von Elektronen aus der Elektrode an das Substrat bzw. Abgabe von Elektronen vom Substrat an die Elektrode, über die Zwischenstufen Redoxreaktion zwischen Substrat und katalytisch redoxaktiver Einheit und Redoxreaktion zwischen redoxaktiver Einheit und Elektrode) wird die elektrochemische Umwandlung des Substrats an der Elektrode beschleunigt. Die elektrokatalytische Aktivität einer an einer Elektrode immobilisierten katalytisch redoxaktiven Einheit reduziert die Aktivierungsenergie der Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt (Energie des energiereichsten Zustandes für den Reaktionsablauf der Umwandlung des Substrats in das Produkt an der Elektrode) und führt dadurch zu einer Verschiebung des für die Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt notwendigen</p>

	<p>Elektrodenpotentials in Richtung des Gleichgewichtspotentials für diese Elektrodenreaktion. Die Erniedrigung des Aktivierungspotentials führt zu einem Abbau der für eine Elektrodenreaktion notwendige Überspannung und damit zu einer Zunahme des Elektronenflusses zwischen Elektrode und Substrat bei einem bestimmten für die Elektrodenreaktion geeigneten Elektrodenpotential (diese Zunahme wird im allgemeinen als katalytischer Strom bezeichnet). Wesentliche Folge der elektrokatalytischen Aktivität ist also, dass die elektrochemische Umwandlung des Substrats in das Produkt in Gegenwart und unter Beteiligung der katalytisch redoxaktiven Einheit bei einem Elektrodenpotential durchgeführt werden kann, bei dem in Abwesenheit der katalytisch redoxaktiven Einheit kein oder nur sehr geringer Strom fließt.</p>
Spezifität der katalytisch redoxaktiven Einheit	<p>die katalytisch redoxaktive Einheit wirkt sowohl in Hinblick auf das mit der katalytisch redoxaktiven Einheit wechselwirkende Substrat als auch in Hinblick auf die mit dem jeweiligen Substrat durchgeführte Reaktion spezifisch. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Redoxreaktionen die bevorzugten Reaktionen zwischen katalytisch redoxaktiver Einheit und Substrat.</p>
Initiationsprozess	<p>bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die katalytisch redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität, also ihre Eigenschaft, z. B. an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben bzw. von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen, erst nach einem Initiationsprozess. Solch ein Initiationsprozess kann die Zugabe von Substrat mit seiner Eigenschaft Ladung auf die katalytisch redoxaktive Einheit zu übertragen sein: So wird die reduktive Eigenschaft einer katalytisch redoxaktiven Einheit erst durch die Übertragung von Elektron(en) vom Substrat auf den/einen Elektron-Donor "D" ermöglicht, entweder in Gegenwart eines Oxidationsmittels, das D^+, jedoch nicht D, oxidieren kann oder weil nach sukzessiver Ladungsübertragung innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit das Elektron von D^+ auf einen Akzeptor "A" übertragen wird (direkt oder über mehrere Elektronentransferschritte zu intermediären Elektron-Akzeptoren) und ein Oxidationsmittel zugegen ist, das nur von diesem reduzierten Akzeptor "A^-" der</p>

	<p>katalytisch redoxaktiven Einheit Elektronen aufnimmt, jedoch nicht von A. Insbesondere kann dieses Oxidationsmittel auch eine Elektrode sein, z. B. wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem D^- (bzw. A^-), jedoch nicht D (bzw. A), oxidiert wird. Andererseits wird die oxidative Eigenschaft einer katalytisch redoxaktiven Einheit erst durch die Übertragung von Elektron(en) von einem Elektron-Donor "D" zum Substrat ermöglicht, entweder in Gegenwart eines Reduktionsmittels, das D^+, jedoch nicht D reduzieren kann oder weil nach sukzessiver Ladungsübertragung innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit ein Elektron von einem Akzeptor "A" auf den oxidierten Donor D^+ übertragen wird (direkt oder über mehrere Elektrontransferschritte von intermediären Elektron-Donoren) und ein Reduktionsmittel zugegen ist, das nur an diesen oxidierten Akzeptor "A^+" der katalytisch redoxaktiven Einheit Elektronen abgibt, jedoch nicht an A. Insbesondere kann dieses Reduktionsmittel auch eine Elektrode sein, z. B. wenn die Elektrode auf ein Potential gesetzt wird, bei dem D^+ (bzw. A^+), jedoch nicht D (bzw. A), reduziert wird.</p>
Redoxaktives Protein/Enzym	<p>besteht in der Regel aus sogenanntem Apoprotein, dem (den) bevorzugten Makromolekül(en) der vorliegenden Erfindung, und Cofaktoren, den Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) im Sinne der vorliegenden Erfindung. Die Redoxaktivität des redoxaktiven Proteins/Enzyms wird durch eine freie redoxaktive Substanz (das spezifische Substrat) ausgelöst.</p>
Oxidase	<p>Klasse redoxaktiver Enzyme, die die Oxidation des für die jeweilige Oxidase spezifischen Substrats katalysieren.</p>
Reduktase	<p>Klasse redoxaktiver Enzyme, die die Reduktion des für die jeweilige Reduktase spezifischen Substrats katalysieren.</p>
Oxidoreduktasen	<p>Oberbegriff für Oxidasen und Reduktasen</p>
GOx	<p>Glucoseoxidase (β-D-glucose: oxygen 1-oxidoreductase, EC 1.1.3.4). Beispiel eines redoxaktiven Proteins/Enzyms. Bei dem Protein/Enzym handelt es sich um ein Enzym aus Apoprotein und FAD als Cofaktor, vgl. Figur 7 und Formel 1. Die GOx liegt als homodimeres Enzym vor (Hecht et al., J. Mol. Biol. 229 (1993), S. 153-172).</p>

ADH	Alkoholdehydrogenase (EC 1.1.1.1). Beispiel eines redoxaktiven Proteins/Enzyms. Bei dem Protein/Enzym handelt es sich um ein Enzym aus Apoprotein aus drei Protein-Untereinheiten und PQQ, Häm sowie einem Häm-Dimer als Cofaktoren (Amayama et al., Methods Enzymol. 89 (1982) 450 - 457)
FDH	Fructosedehydrogenase (EC 1.1.99.11). Beispiel eines redoxaktiven Proteins/Enzyms. Bei dem Protein/Enzym handelt es sich um ein Enzym aus Apoprotein und PQQ als (einen der) Cofaktoren. Die Struktur dieses Enzyms ist unbekannt.
LDH	Lactatdehydrogenase (EC 1.1.1.27), ein Enzym aus Apo-Protein, FMN und Häm.
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid, vgl. Formel 1
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, vgl. Formel 2
PQQ	Pyrrolo-Chinolono-Chinon, entspricht: 4,5-Dihydro-4,5-dioxo-1H-pyrrolo-[2,3-f]-chinolin-2,7,9-tricarboxylsäure, vgl. Formel 3 ($R_1 = R_3 = R_5 = \text{CO}_2\text{H}$; $R_2 = R_4 = \text{H}$) bzw. ein Derivat davon (Formel 3)
Häm	Fe-Protoporphyrin IX, Formel 4 mit $R_2 = R_5 = R_8 = R_{10} = \text{H}$; $R_4 = R_6 = R_9 = R_{12} = \text{CH}_3$; $R_1 = R_3 = \text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}_2^-$; $R_7 = R_9 = \text{CH=CH}_2$ bzw. ein Derivat von Fe-Protoporphyrin (Formel 4)
N ⁶ -(2-Aminoethyl)-FAD	modifiziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid, vgl. Formel 5
N ⁶ -(2-Aminoethyl)-NAD ⁺	modifiziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, vgl. Formel 6
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat (Natriumsalz)
sulfo-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
EDC	(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Alkyl	Der Begriff "Alkyl" bezeichnet eine gesättigte Kohlenwasserstoffgruppe, die geradkettig oder verzweigt ist (z.B. Ethyl, 2,5-Dimethylhexyl oder Isopropyl etc.). Wenn "Alkyl"

	benutzt wird, um auf einen Linker oder Spacer zu verweisen, bezeichnet der Begriff eine Gruppe mit zwei verfügbaren Valenzen für die kovalente Verknüpfung (z. B. $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2-$ oder $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ etc.). Bevorzugte Alkylgruppen als Substituenten oder Seitenketten R sind solche der Kettenlänge 1 – 30 (längste durchgehende Kette von kovalent aneinander gebundenen Atomen). Bevorzugte Alkylgruppen als Linker oder Spacer sind solche der Kettenlänge 1 – 20, insbesondere der Kettenlänge 1 – 14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den durch den Linker oder Spacer verbundenen Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.
Alkenyl	Alkylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-C Einfachbindungen durch C=C Doppelbindungen ersetzt sind.
Alkynyl	Alkyl- oder Alkenylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C \equiv C Dreifachbindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkyl	Alkylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen oder C-C Einfachbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkenyl	Alkenylgruppen, bei denen eine oder mehrere C-H Bindungen, C-C Einfach- oder C=C Doppelbindungen durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
Hetero-Alkynyl	Alkynylgruppen, bei denen eine oder mehrere der C-H Bindungen, C-C Einfach-, C=C Doppel- oder C \equiv C Dreifachbindung durch C-N, C=N, C-P, C=P, C-O, C=O, C-S oder C=S Bindungen ersetzt sind.
Linker	molekulare Verbindung zwischen zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül. In der Regel sind Linker als Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Hetero-Alkyl-, Hetero-Alkenyl- oder Heteroalkynylkette käuflich zu erwerben, wobei die Kette an zwei Stellen mit (gleichen oder

	<p>verschiedenen) reaktiven Gruppen derivatisiert ist. Diese Gruppen bilden in einfachen/bekannten chemischen Reaktionen mit den entsprechenden Reaktionspartner eine kovalente chemische Bindung aus. Die reaktiven Gruppen können auch photoaktivierbar sein, d. h. die reaktiven Gruppen werden erst durch Licht bestimmter oder beliebiger Wellenlänge aktiviert. Bevorzugte Linker sind solche der Kettenlänge 1 – 20, insbesondere der Kettenlänge 1 – 14, wobei die Kettenlänge hier die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen, also zwischen den zwei Molekülen bzw. zwischen einem Oberflächenatom, Oberflächenmolekül oder einer Oberflächenmolekülgruppe und einem anderen Molekül, darstellt.</p>
Spacer	<p>Linker, der über die reaktiven Gruppen an eine oder beide der zu verbindenden Strukturen (siehe Linker) kovalent angebunden ist. Bevorzugte Spacer sind solche der Kettenlänge 1 – 20, insbesondere der Kettenlänge 1 – 14, wobei die Kettenlänge die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen den zu verbindenden Strukturen darstellt.</p>
(n x HS-Spacer)-oligo	<p>Nukleinsäure-Oligomer, an das n Thiofunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei die Spacer jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Thiofunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein und "n" ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.</p>
(n x R-S-S-Spacer)-oligo	<p>Nukleinsäure-Oligomer, an das n Disulfidfunktionen über jeweils einen Spacer angebunden sind, wobei ein beliebiger Rest R die Disulfidfunktion absättigt. Der Spacer zur Anbindung der Disulfidfunktion an das Nukleinsäure-Oligomer kann jeweils eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidfunktion und Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen, insbesondere jeweils eine</p>

	beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14. Diese Spacer können wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diesem durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein. Der Platzhalter n ist eine beliebige ganze Zahl, insbesondere eine Zahl zwischen 1 und 20.
Oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo	zwei gleiche oder verschiedene Nukleinsäure-Oligomere, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, wobei die Disulfidbrücke über zwei beliebige Spacer an die Nukleinsäure-Oligomere angebunden ist und die beiden Spacer eine unterschiedliche Kettenlänge (kürzeste durchgehende Verbindung zwischen Disulfidbrücke und dem jeweiligen Nukleinsäure-Oligomer) aufweisen können, insbesondere jeweils eine beliebige Kettenlänge zwischen 1 und 14 und diese Spacer wiederum an verschiedene natürlich am Nukleinsäure-Oligomer vorhandene oder an diese durch Modifikation angebrachte reaktive Gruppen gebunden sein können.
Mica	Muskovit-Plättchen, Trägermaterial zum Aufbringen dünner Schichten.
Au-S-(CH ₂) ₂ -ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)	Gold-Film auf Mica mit kovalent aufgebrachter Monolayer aus derivatisiertem 12Bp Einzelstrang DNA-Oligonukleotid (Sequenz: TAGTCGGAAGCA). Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH ₂) ₂ -S) ₂ zum P-O-(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Die endständige Base Thymin am 5'-Ende des Oligonukleotids ist am C-5 Kohlenstoff mit -CH=CH-CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ modifiziert, wobei dieser Rest wiederum über seine freie Aminogruppe durch Amidbildung mit der Carbonsäuregruppe des PQQ verbunden ist. An eine weitere noch Carbonsäuregruppe dieses PQQ ist FAD über Amidbildung gebunden, das vorher so modifiziert wurde, das es über eine reaktive Aminogruppe verfügt, z. B. durch Bildung von N ⁶ -(2-Aminoethyl)-FAD (Bückmann et al, 1991, European Patent 0.247.537.B1). Anschließend wird das FAD mit dem Apoprotein der GOx rekonstituiert, so dass ein an der Oberfläche kovalent angebundenes Nukleinsäure-Oligomer entsteht, das zusätzlich –

	über PQQ als kovalent angebundenem Brückenmolekül – kovalent mit der kompletten GOx-Einheit modifiziert ist.
<i>Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)</i>	<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)</i> hybridisiert mit dem zu ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid.
<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD⁺-LDH</i>	Gold-Film auf Mica mit kovalent aufgebrachter Monolayer aus derivatisiertem 12Bp Einzelstrang DNA-Oligonukleotid (Sequenz: TAGTCGGAAGCA). Hierbei ist die endständige Phosphatgruppe des Oligonukleotids am 3' Ende mit (HO-(CH ₂) ₂ -S) ₂ zum P-O-(CH ₂) ₂ -S-S-(CH ₂) ₂ -OH verestert, wobei die S-S Bindung homolytisch gespalten wird und je eine Au-S-R Bindung bewirkt. Die endständige Base Thymin am 5'- Ende des Oligonukleotids ist am C-5 Kohlenstoff mit –CH=CH-CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH ₂ modifiziert, wobei dieser Rest wiederum über seine freie Aminogruppe durch Amidbildung mit der Carbonsäuregruppe des PQQ verbunden ist. An eine weitere Carbonsäuregruppe dieses PQQ ist NAD ⁺ über Amidbildung gebunden, das vorher so modifiziert wurde, das es über eine reaktive Aminogruppe verfügt, z. B. durch Bildung von N ⁶ -(2-Aminoethyl)-NAD ⁺ (Bückmann et al., 1991, European Patent 0.247.537.B1). An diese terminale NAD ⁺ wird die komplette LDH assoziiert.
<i>Au-S-(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD⁺-LDH</i>	<i>Au-S-(CH₂)₂-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD⁺-ADH</i> hybridisiert mit dem zu ss-oligo (Sequenz: TAGTCGGAAGCA) komplementären Oligonukleotid.
<i>E</i>	Elektrodenpotential, das an der Arbeitselektrode anliegt.
<i>E^{eq}</i>	Gleichgewichtspotential einer Elektrodenreaktion
<i>E⁰</i>	"zero current" Potential einer Elektrodenreaktion, Potential das für eine bestimmte Elektrodenreaktion keinen Gesamtstrom (Summe aus oxidativem und reduktivem Strom) liefert.
<i>η</i>	Überpotential einer Elektrodenreaktion
<i>Elektrodenreaktion</i>	Redoxreaktion zwischen einer redoxaktiven Substanz und einer Elektrode (Aufnahme von Elektronen aus der Elektrode durch die redoxaktive Substanz bzw. Abgabe von Elektronen aus der redoxaktiven Substanz an die Elektrode)
<i>E_{ox}</i>	Potential beim Strom-Maximum der Oxidation einer reversiblen

	Elektrooxidation oder -reduktion.
E_{Red}	Potential beim Strom-Maximum der Reduktion einer reversiblen Elektrooxidation oder -reduktion.
i	Stromdichte (Strom pro cm^2 Elektrodenoberfläche)
Cyclovoltametrie	Aufzeichnung einer Strom/Spannungskurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert, ausgehend von einem Potential, bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet bis zu einem Potential, bei dem eine gelöste oder an die Elektrode adsorbierte Spezies oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom und nach Erreichen eines Maximums einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.
Amperometrie	Aufzeichnung einer Strom/Zeitkurve. Hierbei wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode z. B. durch einen Potentialsprung auf ein Potential gesetzt, bei dem die Elektrooxidation oder -reduktion einer gelösten oder adsorbierten Spezies stattfindet und der fließende Strom wird in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.
Potentiometrie	Aufzeichnung eines Elektrodenspannungsverlaufs in Abhängigkeit vom z. B. dem Substratverbrauch. Hierbei wird z. B. das Potential einer stationären Arbeitselektrode auf das "zero current" Potential E^0 des Substrats eingestellt. Bei Verbrauch von Substrat durch die katalytisch redoxaktive Einheit (im Falle der Hybridisierung) ändert sich das "zero current" Potential E^0 in Richtung des Gleichgewichtspotentials E^{eq} . Somit erhält man durch die Aufzeichnung des Potentials in Abhängigkeit von der Zeit (\sim Substratverbrauch) Aufschluß über den Hybridisierungszustand.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Nukleinsäure-Oligomer, das durch chemische Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit modifiziert ist. Die katalytisch redoxaktive

Einheit kann nach Abgabe eines Elektrons an ein externes Oxidationsmittel (Substrat) von einem externen Reduktionsmittel, z. B. einer Elektrode, reduziert oder nach Aufnahme eines Elektrons von einem externen Reduktionsmittel (Substrat) durch ein externes Oxidationsmittel, z. B. einer Elektrode, oxidiert werden. Die katalytisch redoxaktive Einheit ist erfindungsgemäß ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
5 nativer oder modifizierter Alkoholdehydrogenase, nativer oder modifizierter Fruktosedehydrogenase, nativer oder modifizierter Lactatdehydrogenase und nativer oder modifizierter Peroxidase.

Als Nukleinsäure-Oligomer wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine
10 Verbindung aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Nukleotiden oder aus wenigstens zwei kovalent verbundenen Pyrimidin- (z. B. Cytosin, Thymin oder Uracil) oder Purin-Basen (z. B. Adenin oder Guanin), bevorzugt ein DNA-, RNA- oder PNA-Fragment, verwendet. In der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Begriff Nukleinsäure auf ein beliebiges "Rückgrat" der kovalent verbundenen Pyrimidin- oder
15 Purin-Basen, wie z. B. auf das Zucker-Phosphat Rückgrat der DNA, cDNA oder RNA, auf ein Peptid-Rückgrat der PNA oder auf analoge Rückgrat-Strukturen, wie z. B. ein Thio-Phosphat-, ein Dithio-Phosphat- oder ein Phosphoramid-Rückgrat. Wesentliches Merkmal einer Nukleinsäure im Sinne der vorliegenden Erfindung ist, dass sie natürlich vorkommende cDNA oder RNA sequenzspezifisch binden kann. Alternativ zu dem
20 Begriff "Nukleinsäure-Oligomer" werden die Begriffe "(Sonden-) Oligonukleotid", "Nukleinsäure" oder "Oligomer" verwendet.

Der Begriff "Elektron-Akzeptor" bzw. "Elektron-Akzeptor-Molekül" und der Begriff "Elektron-Donor" bzw. "Elektron-Donor-Molekül" bezeichnet im Rahmen der vorliegenden Erfindung
25 einen Bestandteil (ein redoxaktives Zentrum bzw. einen Kofaktor bzw. eine prosthetische Gruppe) einer katalytisch redoxaktiven Einheit.

Eine mit dem Oberbegriff "katalytisch redoxaktive Einheit" bezeichnete Einheit besteht in der Regel aus einem oder mehreren redoxaktiven Zentren (Cofaktoren, prosthetischen Gruppen), die im folgenden als Elektron-Donoren bzw. Elektron-Akzeptoren bezeichnet werden, und einem oder mehreren diese redoxaktiven Zentren bindenden Makromolekülen. Bei den erfindungsgemäßen katalytisch redoxaktiven Einheiten handelt es sich um native oder modifizierte Alkoholdehydrogenase, native oder modifizierte Fruktosedehydrogenase, native oder modifizierte
35 Lactatdehydrogenase und native oder modifizierte Peroxidase. Die katalytisch redoxaktive Einheit enthält also ein oder mehrere Elektron-Donor-Moleküle und/oder ein oder mehrere Elektron-Akzeptor-Moleküle, wobei dieses (diese) Elektron-Donor-Molekül(e) und/oder dieses (diese) Elektron-Akzeptor-Molekül(e) an ein oder mehrere

Makromoleküle gebunden sind bzw. in diese(s) Makromolekül(e) eingebettet sind. Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) können untereinander durch eine oder mehrere kovalente oder ionische Bindungen, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, durch π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation miteinander verbunden sein, wobei kovalente Verbindungen direkte oder indirekte (z. B. über einen Spacer, nicht aber über ein Nukleinsäure-Oligomer) Verbindungen sein können. Daneben können die Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) mit dem (den) Makromolekül(en) durch kovalente Anbindung an das (die) Makromolekül(e), durch Einkapseln in passende molekulare Kavitäten (Bindungstaschen) des Makromoleküls (der Makromoleküle), durch ionische Bindungen, Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation zwischen dem(n) Makromolekül(en) und dem(n) Elektron-Donor-Molekül(en) und/oder dem(n) Elektron-Akzeptor-Molekül(en) verbunden sein. Sind mehrere Makromoleküle Bestandteil der katalytisch redoxaktiven Einheit kann die Bindung der Makromoleküle untereinander ebenfalls kovalent, ionisch, durch Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Brücken, π - π -Wechselwirkung oder durch Koordination mittels Elektronenpaar-Donation und -Akzeptation erfolgen. Eine katalytisch redoxaktive Einheit kann im Minimalfall auch nur aus einem Makromolekül bestehen, wobei das Makromolekül dann in seiner erfindungsrelevanten Erscheinungsform auch als Elektron-Donor bzw. -Akzeptor wirkt. Sie kann auch nur aus einem Elektron-Donor bzw. -Akzeptor bestehen. Daneben kann die katalytisch redoxaktive Einheit auch durch spontane Zusammenlagerung der Bestandteile in Lösung (in situ) gebildet werden.

Die angesprochenen Donor- und/oder Akzeptor-Moleküle bilden zusammen mit den Makromolekülen eine katalytisch redoxaktive Einheit, d. h. sie sind direkt oder über weitere Molekülteile aneinander gebunden. Einzige Einschränkung der die Bestandteile der katalytisch redoxaktiven Einheit verbindenden Moleküle oder Molekülteile ist der Ausschluß von Nukleinsäure-Oligomeren. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist die katalytisch redoxaktive Einheit als eine komplette Einheit an das Sonden-Oligonukleotid gebunden, wobei natürlich mehrere chemische Bindungen zwischen Oligonukleotid und der redoxaktiven Einheit ausgebildet werden können. Durch den Ausschluß von Nukleinsäure-Oligomeren als die die Bestandteile der katalytisch redoxaktiven Einheit verbindenden Moleküle oder Molekülteile soll verdeutlicht werden, dass nicht einzelne Teile der katalytisch redoxaktiven Einheit an verschiedenen Stellen des Sonden-Oligonukleotids angebunden sind. Das Sonden-Oligonukleotid stellt also explizit nicht die Verbindung zwischen den Elektron-Donor-Molekül(en) und den Makromolekülen

und/oder den Elektron-Akzeptor-Molekül(en) und den Makromolekülen der katalytisch redoxaktiven Einheit dar.

Die Redoxaktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit, also deren Eigenschaft unter bestimmten äußeren Umständen an ein geeignetes Oxidationsmittel Elektronen abzugeben (bzw. von einem geeigneten Reduktionsmittel Elektronen aufzunehmen), wird durch einen Initiationsprozeß, z. B. erst nach Reduktion (bzw. nach Oxidation) durch das Substrat, entfaltet. Bei entsprechend gewählten äußeren Umständen entfaltet die katalytisch redoxaktive Einheit ihre Redoxaktivität erst nach dem Initiationsprozess "Zugabe von Substrat mit der Eigenschaft Ladung auf die katalytisch redoxaktive Einheit zu übertragen": So wird die reduktive Eigenschaft einer katalytisch redoxaktiven Einheit erst durch die Übertragung von Elektron(en) vom Substrat auf den/einen Elektron-Donor "D" ermöglicht, entweder in Gegenwart eines externen Oxidationsmittels (z. B. der Elektrode mit entsprechend gewähltem Potential), das D^- , jedoch nicht D, oxidieren kann oder weil nach sukzessiver Ladungsübertragung innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit das Elektron von D^- auf einen Akzeptor "A" übertragen wird (direkt oder über mehrere Elektrontransferschritte zu intermediären Elektron-Akzeptoren) und ein Oxidationsmittel zugegen ist, das nur von diesem reduzierten Akzeptor "A" der katalytisch redoxaktiven Einheit Elektronen aufnimmt, jedoch nicht von A (z. B. in Gegenwart einer Elektrode mit entsprechend gewähltem Potential). Andererseits wird die oxidative Eigenschaft einer katalytisch redoxaktiven Einheit erst durch die Übertragung von Elektron(en) von einem Elektron-Donor "D" zum Substrat ermöglicht, entweder in Gegenwart eines Reduktionsmittels (z. B. der Elektrode mit entsprechend gewähltem Potential), das D^+ , jedoch nicht D reduzieren kann oder weil nach sukzessiver Ladungsübertragung innerhalb der katalytisch redoxaktiven Einheit ein Elektron von einem Akzeptor "A" auf den oxidierten Donor D^+ übertragen wird (direkt oder über mehrere Elektrontransferschritte von intermediären Elektron-Donoren) und ein Reduktionsmittel zugegen ist, das nur an diesen oxidierten Akzeptor "A" der katalytisch redoxaktiven Einheit Elektronen abgibt, jedoch nicht an A (z. B. in Gegenwart einer Elektrode mit entsprechend gewähltem Potential).

Wesentliche Merkmale der katalytisch redoxaktiven Einheit sind neben der Zusammensetzung aus Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en): (i) die Einheit ist in den erfindungsrelevanten Erscheinungsformen (Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en)) im ursprünglichen bzw. oxidierten oder reduzierten Zustand) stabil und dissoziiert nicht in ihre Bestandteile, (ii) die elektrkatalytische Aktivität der Einheit (siehe unten), (iii) die Einheit enthält keine Nukleinsäure, (iv) die Zusammensetzung der Einheit aus Elektron-Donor(en) und/oder Elektron-Akzeptor(en) und Makromolekül(en) kann - unabhängig

von der Bindung zwischen den Bestandteilen - vom Fachmann erkannt werden, da die redoxaktiven Zentren (Cofaktoren, prosthetischen Gruppen) und die zugehörige Matrix aus Makromolekül(en) (z. B. das Apoprotein bei Enzymen als Beispiel einer katalytisch redoxaktiven Einheit) prinzipiell auch getrennt voneinander vorkommen können.

5

Das für eine bestimmte katalytisch redoxaktive Einheit spezifische Substrat ist ein freies, nicht kovalent mit der katalytisch redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbundenes, aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt stehendes Oxidations- oder Reduktionsmittel, wobei das Substrat z. B. ein geladenes oder ungeladenes Molekül, ein beliebiges Salz, ein Ion oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxidoreduktase) sein kann. Das Substrat ist dadurch gekennzeichnet, dass sie von der katalytisch redoxaktiven Einheit durch die Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen zwischen Substrat und katalytisch redoxaktiver Einheit erkannt wird und den Donor (bzw. den Akzeptor) der katalytisch redoxaktiven Einheit reduzieren (bzw. oxidieren) kann, wobei die katalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit diese Redoxreaktion des Substrats zum Produkt beschleunigt (katalysiert).

15

Die katalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit wirkt sich beschleunigend auf die spezifische Reaktion zwischen der Einheit und dem zugehörigen Substrat aus und ermöglicht so einen Reaktionsablauf, der ohne die katalytische Aktivität der Einheit (z. B. in Form des Substrats und des nicht gebundenen Cofaktors in Lösung) nicht bzw. nur in nicht wahrnehmbarem Umfang stattfindet. Diese katalytische Aktivität der redoxaktiven Einheit wird durch Stabilisierung des jeweiligen Übergangszustands, d.h. der energiereichsten Spezies im Reaktionsablauf zwischen katalytisch redoxaktiver Einheit und zugehörigem Substrat, erreicht.

20

25

Die elektrokatalytische Aktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit steht in engem Bezug zur katalytischen Aktivität der Einheit. Durch die Anwesenheit der katalytisch redoxaktiven Einheit und deren Einbindung in den Reaktionsablauf der Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt (Ablauf der Gesamtreaktion der elektrochemischen Redoxreaktion zwischen einer Elektrode und dem Substrat, d.h. Abgabe von Elektronen aus der Elektrode an das Substrat bzw. Abgabe von Elektronen vom Substrat an die Elektrode, über die Zwischenstufen Redoxreaktion zwischen Substrat und katalytisch redoxaktiver Einheit und Redoxreaktion zwischen redoxaktiver Einheit und Elektrode) wird die elektrochemische Umwandlung des Substrats an der Elektrode beschleunigt. Die elektrokatalytische Aktivität einer an einer Elektrode immobilisierten katalytisch redoxaktiven Einheit reduziert die Aktivierungsenergie der Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt (Energie des energiereichsten Zustandes für den Reaktionsablauf der Umwandlung des Substrats in das

30

35

Produkt an der Elektrode) und führt dadurch zu einer Verschiebung des für die Elektrodenreaktion des Substrats zum Produkt notwendigen Elektrodenpotentials in Richtung des Gleichgewichtspotentials für diese Elektrodenreaktion. Die Erniedrigung des Aktivierungspotentials führt zu einem Abbau der für eine Elektrodenreaktion notwendige
5 Überspannung und damit zu einer Zunahme des Elektronenflusses zwischen Elektrode und Substrat bei einem bestimmten für die Elektrodenreaktion geeigneten Elektrodenpotential (diese Zunahme wird im allgemeinen als katalytischer Strom bezeichnet). Wesentliche Folge der elektrokatalytischen Aktivität ist also, dass die elektrochemische Umwandlung des Substrats in das Produkt in Gegenwart und unter Beteiligung der katalytisch
10 redoxaktiven Einheit bei einem Elektrodenpotential durchgeführt werden kann, bei dem in Abwesenheit der katalytisch redoxaktiven Einheit kein oder nur sehr geringer Strom fließt.

Die katalytisch redoxaktive Einheit wirkt sowohl in Hinblick auf das mit der katalytisch redoxaktiven Einheit wechselwirkende Substrat als auch in Hinblick auf die mit dem
15 jeweiligen Substrat durchgeführte Reaktion spezifisch. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Redoxreaktionen die bevorzugten Reaktionen zwischen katalytisch redoxaktiver Einheit und Substrat.

Mit dem Begriff "Reduktionsmittel" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine
20 chemische Verbindung (chemische Substanz) bezeichnet, die durch Abgabe von Elektronen an eine andere chemische Verbindung (chemische Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) diese andere chemische Verbindung (chemische Substanz, Elektron-Donor, Elektron-Akzeptor) reduziert. Das Reduktionsmittel verhält sich analog zu einem Elektron-Donor, wird aber im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Begriff für einen
25 externen, nicht unmittelbar zur redoxaktiven Einheit gehörigen Elektron-Donor verwendet. "Nicht unmittelbar" bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das Reduktionsmittel entweder eine freie redoxaktive Substanz ist, die nicht an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden ist, aber mit diesem in Kontakt steht oder dass das Reduktionsmittel kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden ist, jedoch an einer Stelle des Nukleinsäure-
30 Oligomers, die mindestens zwei kovalent verbundene Nukleotide oder wenigstens zwei kovalent verbundene Pyrimidin- oder Purin-Basen von der kovalenten Anbindungsstelle der redoxaktiven Einheit entfernt ist. Insbesondere kann die Elektrode das Reduktionsmittel darstellen.

35 Mit dem Begriff "freie redoxaktive Substanz" wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein freies, nicht kovalent mit der redoxaktiven Einheit, dem Nukleinsäure-Oligomer oder der leitfähigen Oberfläche verbundenes, aber mit diesen, z. B. über die der modifizierten leitfähigen Oberfläche zugefügte Lösung, in Kontakt stehendes Oxidations- oder Reduktionsmittel bezeichnet, wobei die freie redoxaktive Substanz z. B. ein

ungeladenes Molekül, eine beliebiges Salz, ein Ion oder ein redoxaktives Protein oder Enzym (Oxidoreductase) sein kann. Die freie redoxaktive Substanz ist dadurch gekennzeichnet, dass sie den Donor (bzw. den Akzeptor) der katalytisch redoxaktiven Einheit reduzieren (bzw. oxidieren) kann. Insbesondere ist das spezifische Substrat der katalytisch redoxaktiven Einheit eine freie, redoxaktive Substanz.

Das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer ist direkt oder indirekt (über einen Spacer) an eine leitfähige Oberfläche gebunden. Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird jede elektrisch leitfähige Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere metallische Oberflächen, Oberflächen aus Metallegierungen oder dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen, wobei sämtliche Halbleiter als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden können. Die leitfähige Oberfläche kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung alleine oder auf einem beliebigen Trägermaterial, wie z. B. Glas, aufgebracht vorliegen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "Elektrode" alternativ zu "leitfähige Oberfläche" gebraucht.

Unter dem Begriff "modifizierte leitfähige Oberfläche" wird eine leitfähige Oberfläche verstanden, die durch Anbindung eines mit einer katalytisch redoxaktiven Einheit modifizierten Nukleinsäure-Oligomers modifiziert ist. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird der Begriff "funktionalisierte Elektrode" alternativ zum Begriff "modifizierte leitfähige Oberfläche" gebraucht.

Gemäß eines weiteren Aspekts betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, das die elektrochemische Detektion molekularer Strukturen wie z. B. die Detektion des Substrats, insbesondere aber die elektrochemische Detektion von DNA-/RNA-/PNA-Fragmenten in einer Probenlösung durch sequenzspezifische Nukleinsäure-Oligomer-Hybridisierung ermöglicht. Die Detektion der Hybridisierungsereignisse durch elektrische Signale ist eine einfache und kostengünstige Methode und ermöglicht in einer batteriebetriebenen Variante den Einsatz vor Ort.

Außerdem stellt die vorliegende Erfindung ein Ausleseverfahren zur Detektion molekularer Strukturen zur Verfügung, unter anderem zur parallelen Detektion von Hybridisierungsereignissen auf einem Oligomer-Chip durch Auslesen elektrischer Signale in einem Mikroelektroden-Array. Erfindungsgemäß wird unter einem über Mikroelektroden ansteuerbaren Ausleseverfahren ein Verfahren verstanden, bei dem die Detektion molekularer Strukturen auf einer bestimmten Elektrode innerhalb des mit katalytisch redoxaktiven Einheiten funktionalisierten Elektroden-Arrays durch elektrische Ansteuerung dieser Elektrode, z. B. direkt oder über cMOS-Technologie erreicht wird. Desweiteren kann eine parallele Detektion von Hybridisierungsereignissen

auch dadurch erreicht werden, dass entweder beim Aufbau der verschiedenen funktionalisierten Elektroden eines Elektroden-Arrays verschiedene katalytisch redoxaktive Einheiten für die einzelnen Elektroden des Arrays verwendet werden oder dass eine durchgängig leitfähige Oberfläche zum Aufbau der funktionalisierten Elektroden verwendet wird und die Unterscheidbarkeit molekularer Strukturen auf einem bestimmten Bereich mit identischem Elektrodenaufbau (eines bestimmten Test-Sites) innerhalb des Gesamtsystems (des kompletten Oligomer-Chips) dadurch erreicht wird, dass für die einzelnen Test-Sites verschiedene katalytisch redoxaktive Einheiten verwendet werden, die über die selektive Zugabe des jeweiligen spezifischen Substrats angesprochen werden können. Bei letzterer Variante wird aufgrund der durchgängigen leitfähigen Oberfläche die elektrochemische Antwort des gesamten Oligomerchips detektiert, die Adressierung und das Auslesen der elektrochemischen Antwort einzelner Testsites erfolgt durch die selektive Zugabe des jeweils für dieses Test-Site spezifischen Substrats.

Weiterhin stellt die Erfindung in der Ausführungsform eines Elektroden-Arrays aus Elektroden, die mit jeweils unterschiedlichen katalytisch redoxaktiven Einheiten funktionalisiert wurden, ein über Mikroelektroden ansteuerbares Detektionsverfahren zur parallelen qualitativen und quantitativen Detektion von redoxaktiven Substanzen, dem jeweiligen Substrat der verschiedenen katalytisch redoxaktiven Einheiten der Elektroden innerhalb eines Elektroden-Arrays, dar.

Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer

Voraussetzung für das erfindungsgemäße Verfahren ist die Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer. Bei der katalytisch redoxaktiven Einheit kann es sich um native oder modifizierte Alkoholdehydrogenase, native oder modifizierte Fruktosedehydrogenase, native oder modifizierte Lactatdehydrogenase und native oder modifizierte Peroxidase handeln.

Katalytisch redoxaktive Einheiten sind:

(i) die in der folgenden Tabelle 1 zusammengestellten Oxidoreduktasen. Die kovalente Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit (des redoxaktiven Proteins/Enzyms) erfolgt im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt über eine kovalente Anbindung des Cofaktors mit anschließender Rekonstitution des Apoproteins an den an das Nukleinsäure-Oligomer angebindenen Cofaktor. Bei katalytisch redoxaktiven Einheiten (redoxaktiven Proteinen/Enzymen) mit mehreren Cofaktoren wird einer der

Cofaktoren (in der nachfolgenden Tabelle 1 fett gedruckt) kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden und die katalytisch redoxaktive Einheit durch Rekonstitution mit den restlichen Cofaktoren und dem Apoprotein komplettiert.

- 5 Tabelle 1: Redoxaktiver Enzyme (Oxidoreduktasen) als katalytisch redoxaktive Einheiten.

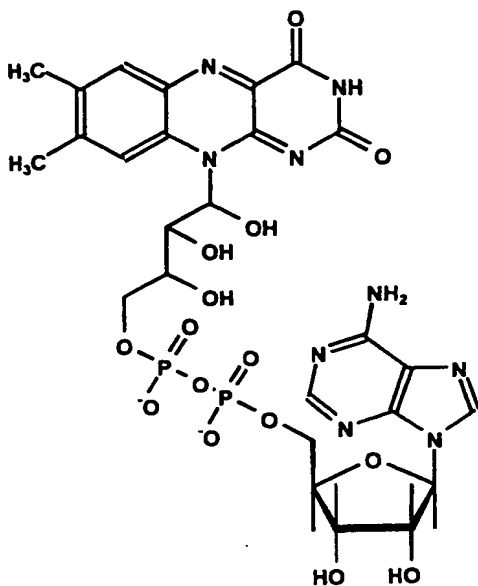
Enzym	Cofaktor	Substrat	katalysierte Enzymreaktion
Alkoholdehydrogenase	PQQ , Häm, Häm-Dimer	Ethanol	Ethanol + PQQ → Acetaldehyd + PQQH₂
Fructosedehydrogenase	PQQ , Häm, ...	Fructose	D-Fructose + PQQ → 5-Keto-D-Fructose + PQQH₂
Lactatdehydrogenase	FMN , Häm	Lactat	Lactat + FMN → Pyruvat + FMNH₂
Peroxidasen (z. B. Meerrettichperoxidase, Lactoperoxidase, Cytochrom c Peroxidase, Fungal Peroxidase etc.)	Häm		

- 10 (ii) modifizierte redoxaktive Proteine/Enzyme wie unter (i) vorgestellt, die durch Proteinengineering oder Genmutation verändert wurden und weiterhin katalytische bzw. elektrokatalytische Aktivität besitzen.

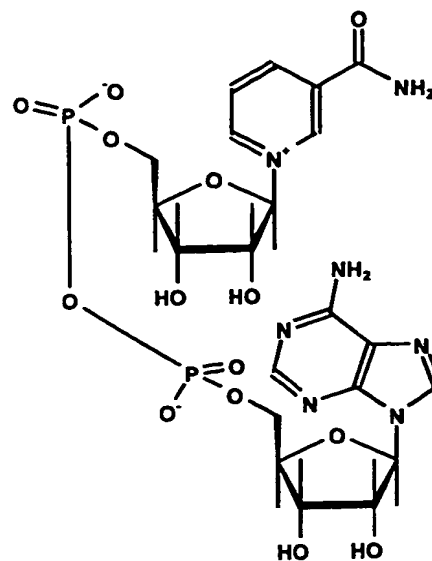
- 15 (iii) NAD^+ -abhängige Enzyme, also Lactatdehydrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) oder Alkoholdehydrogenase (ADH, EC 1.1.1.1). Bei der Verwendung von NAD^+ -abhängige Enzymen kann die katalytisch redoxaktive Einheit (z. B. LDH oder ADH) an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden werden, indem (modifiziertes) NAD^+ direkt oder über einen Spacer (Beispiel 3) kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden wird und das NAD^+ -abhängige Enzym dann durch nichtkovalente Wechselwirkung mit dem
- 20 (modifizierten) NAD^+ assoziiert.

Die Figur 7 zeigt das Monomer der Glucoseoxidase (GOx). Das Apoprotein besteht aus α -helikalen und β -Faltblatt Domänen, das Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) ist in Form des raumfüllenden Schalottenmodells eingezeichnet. Die Struktur des FAD ist

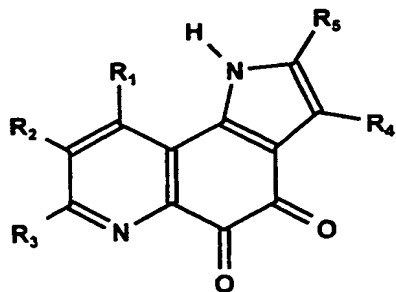
in Formel 1 gezeigt. In seiner nativen Erscheinungsform liegt die GOx als Homodimer vor.



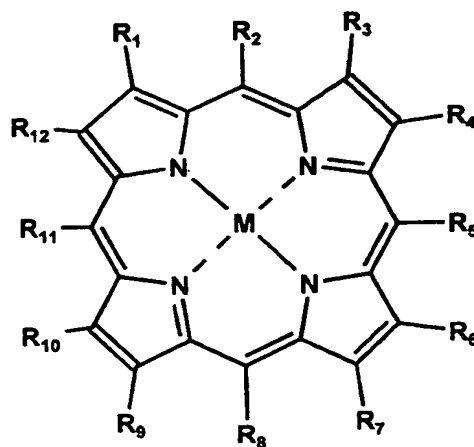
Formel 1



Formel 2

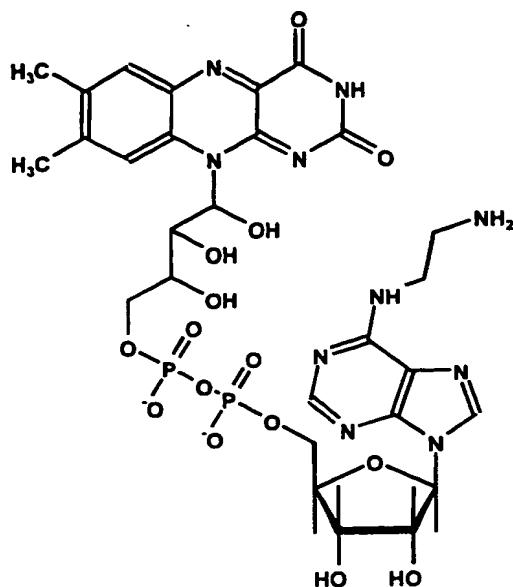


Formel 3

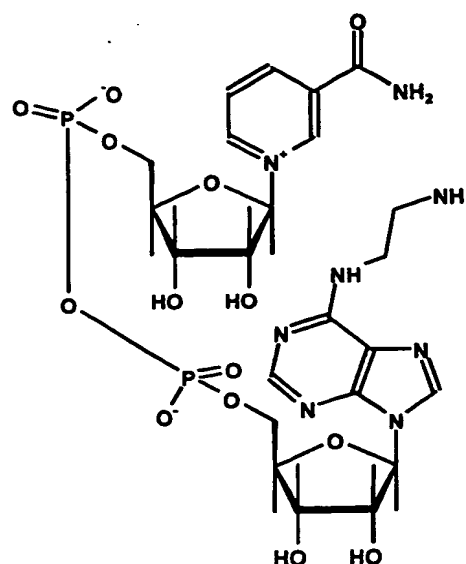


Formel 4

M = 2H, Mg, Zn, Cu, Ni, Pd, Co, Cd, Mn, Fe(II), Fe(III), Sn, Pt etc.; R₁ bis R₁₂ sind unabhängig voneinander H oder beliebige Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinyl-Substituenten.



Formel 5



Formel 6

5 Daneben zeichnet sich die katalytisch redoxaktive Einheit erfindungsgemäß dadurch aus, dass besagte Einheit an ein ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebondenes Oxidationsmittel Elektronen abgibt bzw. von einen anderen ebenfalls kovalent an das Oligonukleotid angebondenen Reduktionsmittel Elektronen aufnimmt, wobei dieses Oxidations- oder Reduktionsmittel insbesondere eine elektrisch leitfähige Oberfläche (Elektrode) sein kann und die katalytisch redoxaktive Einheit, insbesondere das redoxaktive Zentrum der Einheit, durch Anlegen einer äußeren Spannung an dieser Elektrode im elektrochemisch zugänglichen Potentialbereich der Elektrode elektrooxidiert/-reduziert werden kann.

15 Die katalytisch redoxaktive Einheit zeichnet sich erfindungsgemäß dadurch aus, dass das redoxaktive Zentrum der Einheit (direkt oder nach der spezifischen Reaktion mit dem Substrat) an einer Elektrode oxidiert bzw. reduziert werden kann und der Ursprungszustand der katalytisch redoxaktiven Einheit – vor der Oxidation bzw. Reduktion an der Elektrode – durch die spezifische Reaktion der katalytisch redoxaktiven Einheit mit dem zugehörigem Substrat in einer spezifischen katalytischen Reaktion wiederhergestellt wird. Erfindungsgemäß kann dazu jede katalytisch redoxaktive Einheit verwendet werden, solange sie bzw. das redoxaktive Zentrum der katalytisch redoxaktiven Einheit bei einem Potential ϕ , das der Bedingung $2,0 \text{ V} \geq \phi \geq -2,0 \text{ V}$ genügt, oxidierbar und reduzierbar ist. Das Potential bezieht sich hierbei auf das freie, unmodifizierte, redoxaktive Zentrum der katalytisch redoxaktiven Einheit in einem

geeigneten Lösungsmittel, gemessen gegen Normalwasserstoffelektrode. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist der Potentialbereich $1,7 \text{ V} \geq \varphi \geq -1,7 \text{ V}$ bevorzugt, wobei der Bereich $1,4 \text{ V} \geq \varphi \geq -1,2 \text{ V}$ besonders bevorzugt ist und der Bereich $0,9 \text{ V} \geq \varphi \geq -0,7 \text{ V}$, in dem die redoxaktiven Zentren der Anwendungsbeispiele oxidiert (und rereduziert) werden, ganz besonders bevorzugt ist.

Weiterhin zeichnet sich die katalytisch redoxaktive Einheit erfindungsgemäß dadurch aus, dass durch Einbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit in die elektrochemische Oxidation oder Reduktion das für die redoxaktive Zentrum der Einheit spezifische Substrat elektrokatalytisch an einer Elektrode oxidiert bzw. reduziert wird, d. h. bei einem Potential bei dem in Abwesenheit der katalytisch redoxaktiven Einheit kein oder nur sehr geringer Strom fließen würde bzw. unter Entstehen eines katalytischen (Zusatz-)Stroms.

Erfindungsgemäß wird eine katalytisch redoxaktive Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer kovalent durch die Reaktion des Nukleinsäure-Oligomers mit der katalytisch redoxaktiven Einheit oder Teilen davon (siehe auch Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung") gebunden. Diese Bindung kann auf fünf verschiedene Arten durchgeführt werden:

a) Als reaktive Gruppe zur Bindungsbildung am Nukleinsäure-Oligomer wird eine freie Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere eine Gruppe an einem der beiden Enden des Oligonukleotid-Rückgrats, verwendet. Die freien, endständigen Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Aminogruppen bzw. mit Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. mit Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. mit Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen $\text{CH}=\text{N}$ Bindung zur $\text{CH}_2\text{-NH}$ Bindung ein. Die zur kovalenten Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit nötige Kopplungsgruppe (Säure-, Amin-, Alkohol-, Thioalkohol- oder Aldehydfunktion) ist entweder natürlicherweise an der katalytisch redoxaktiven Einheit vorhanden oder wird durch chemische Modifikation der katalytisch redoxaktiven Einheit erhalten. Die Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Teilen der Einheit mit anschließender Vervollständigung der katalytisch redoxaktiven Einheit erfolgen (siehe unten).

- b) Das Nukleinsäure-Oligomer ist über einen kovalent angebondenen Molekülteil (Spacer) beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge (längste durchgehende Kette von aneinander gebundenen Atomen), insbesondere der Kettenlänge 1 bis 14, am Oligonukleotid-Rückgrat bzw. an einer Base mit einer reaktiven Gruppe modifiziert. Die Modifikation erfolgt bevorzugt an einem der Enden des Oligonukleotid-Rückgrats bzw. an einer terminalen Base. Als Spacer kann z.B. ein Alkyl-, Alkenyl-, Alkiny-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkinylsubstituent verwendet werden. Mögliche einfache Reaktionen zur Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen katalytisch redoxaktiver Einheit und des so modifizierten Nukleinsäure-Oligomers sind wie unter a) beschrieben, die Amidbildung aus Säure- und Amino-Gruppe, die Esterbildung aus Säure- und Alkohol-Gruppe, die Thioesterbildung aus Säure- und Thio-Alkohol-Gruppe oder die Kondensation von Aldehyd und Amin mit anschließender Reduktion der entstandenen $\text{CH}=\text{N}$ Bindung zur $\text{CH}_2\text{-NH}$ Bindung. Die Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Teilen der katalytisch redoxaktiven Einheit mit anschließender Vervollständigung der Einheit erfolgen (siehe unten).
- c) Im Falle von katalytisch redoxaktiven Einheiten, die FAD/FADH_2 als Cofaktoren besitzen wird bei der Synthese des Nukleinsäure-Oligomers als terminale Base ein phosphoryliertes Adenin verwendet und dieses durch Fusion mit Flavin-Mononukleotid zu einem FAD-Derivat ($\beta\text{-D-2-Desoxiribose-FAD}$) modifiziert und die katalytisch redoxaktive Einheit durch Rekonstitution mit der von (einem) FAD befreiten katalytisch redoxaktiven Einheit komplettiert.
- d) Bei Verwendung NAD^+/NADH -abhängiger Enzyme (Enzyme aus Cofaktor(en) und Apoprotein(en), die für einen vollständigen Ablauf des katalytischen Reaktionszyklus neben dem spezifischen Substrat auch NAD^+ bzw. NADH benötigen wie z. B. die Lactatdehydrogenase (LDH) oder die Alkoholdehydrogenase (ADH)) kann die katalytisch redoxaktive Einheit (z. B. das LDH oder ADH) an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden werden, indem (modifiziertes) NAD^+ direkt (wie hier unter (a) beschrieben) oder über einen Spacer (wie hier unter (b) bzw. in Beispiel 3 beschrieben) kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden wird und das NAD^+ -abhängige Enzym dann durch nichtkovalente Wechselwirkung mit dem (modifizierten) NAD^+ assoziiert wird.
- e) Bei der Synthese des Nukleinsäure-Oligomers wird eine terminale Base bzw. ein terminales Nukleotid durch einen Cofaktor der katalytisch redoxaktive Einheit ersetzt und die katalytisch redoxaktive Einheit durch Rekonstitution mit der von diesem Cofaktor befreiten katalytisch redoxaktiven Einheit komplettiert (siehe unten).

Erfindungsgemäß kann die Bindung der katalytisch redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer ganz oder in Teilen vor oder nach der Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche erfolgen. So kann im Falle eines redoxaktiven Proteins/Enzyms aus Apoprotein und Cofaktor(en) statt der kompletten katalytisch redoxaktiven Einheit auch nur das Apoprotein, das Apoprotein und ein Teil der Cofaktoren oder ein oder mehrere Cofaktoren angebunden sein und die katalytisch redoxaktive Einheit wird durch anschließende Rekonstitution mit den noch fehlenden Teilen komplettiert.

- 10 Bei mehreren verschiedenen Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen (Test-Sites) auf einem Elektroden-Array ist es vorteilhaft, die (kovalente) Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit an die Nukleinsäure-Oligomere durch geeignete Wahl der reaktiven Gruppe an den freien Nukleinsäure-Oligomerenden der verschiedenen Elektroden/Test-Sites für die gesamte Oberfläche zu vereinheitlichen, wenn die katalytisch redoxaktive Einheit nach Immobilisierung des Nukleinsäure-Oligomers an der Oberfläche angebunden werden soll.

- Bei Verwendung von redoxaktiven Proteinen/Enzymen als katalytisch redoxaktiver Einheit kann die kovalente Anbindung des Nukleinsäure-Oligomers an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe des Proteins erfolgen oder - in dem Falle, dass das redoxaktive Protein/Enzym aus Apoprotein und Cofaktor(en) besteht - an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe eines (beliebigen) Cofaktors. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist die kovalente Anbindung an eine beliebige, natürlicherweise vorhandene oder durch Modifikation angebrachte, reaktive Gruppe eines (beliebigen) Cofaktors des Proteins bevorzugt. Ohne an mechanistische Details gebunden sein zu wollen, ist bei mehreren Cofaktoren derjenige besonders bevorzugt, der Elektronen an ein externes, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebundenes Oxidationsmittel abgeben oder von einem externen, ebenfalls kovalent an das Nukleinsäure-Oligomer angebundenes Reduktionsmittel aufnehmen kann (siehe auch Abschnitt "Verfahren zur amperometrischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden").

35 Die leitfähige Oberfläche

Unter dem Begriff "leitfähige Oberfläche" wird erfindungsgemäß jeder Träger mit einer elektrisch leitfähigen Oberfläche beliebiger Dicke verstanden, insbesondere

Oberflächen aus Platin, Palladium, Gold, Cadmium, Quecksilber, Nickel, Zink, Kohlenstoff, Silber, Kupfer, Eisen, Blei, Aluminium und Mangan.

- 5 Daneben können auch beliebige dotierte oder nicht dotierte Halbleiteroberflächen beliebiger Dicke verwendet werden. Sämtliche Halbleiter können als Reinsubstanzen oder als Gemische Verwendung finden. Als nicht einschränkend gemeinte Beispiele seien an dieser Stelle Kohlenstoff, Silizium, Germanium, α -Zinn, Cu(I)- und Ag(I)-Halogenide beliebiger Kristallstruktur genannt. Geeignet sind ebenfalls sämtliche binären Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den
- 10 Elementen der Gruppen 14 und 16, den Elementen der Gruppen 13 und 15, sowie den Elementen der Gruppen 15 und 16. Daneben können ternäre Verbindungen beliebiger Zusammensetzung und beliebiger Struktur aus den Elementen der Gruppen 11, 13 und 16 oder den Elementen der Gruppen 12, 13 und 16 verwendet werden. Die Bezeichnungen der Gruppen des Periodensystems der Elemente beziehen sich auf die
- 15 IUPAC-Empfehlung von 1985.

Bindung eines Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche

- 20 Erfindungsgemäß wird ein Nukleinsäure-Oligomer direkt oder über einen Linker/Spacer mit den Oberflächenatomen oder -molekülen einer leitfähigen Oberfläche der oben beschriebenen Art verknüpft. Diese Bindung kann auf drei verschiedene Arten durchgeführt werden:
- 25 a) Die Oberfläche wird so modifiziert, dass eine reaktive Molekül-Gruppe zugänglich ist. Dies kann durch direkte Derivatisierung der Oberflächenmoleküle, z. B. durch naßchemische oder elektrochemische Oxidation/Reduktion geschehen. So kann z. B. die Oberfläche von Graphitelektroden durch Oxidation naßchemisch mit Aldehyd- oder Carbonsäure-Gruppen versehen werden. Elektrochemisch besteht z. B. die Möglichkeit
- 30 durch Reduktion in Gegenwart von Aryl-Diazoniumsalzen das entsprechende (funktionalisierte, also mit einer reaktiven Gruppe versehene) Aryl-Radikal oder durch Oxidation in Gegenwart von $R'CO_2H$ das (funktionalisierte) R' -Radikal auf der Graphit-Elektrodenoberfläche anzukoppeln. Ein Beispiel der direkten Modifikation von Halbleiteroberflächen ist die Derivatisierung von Siliziumoberflächen zu reaktiven
- 35 Silanolen, d. h. Silizium-Träger mit $Si-OR''$ Gruppen an der Oberfläche, wobei R'' ebenso wie R' einen beliebigen, funktionalisierten, organischen Rest darstellt (z.B. Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Heteroalkyl-, Heteroalkenyl- oder Heteroalkynylsubstituent). Alternativ kann die gesamte Oberfläche durch die kovalente Anbindung einer reaktiven Gruppe eines bifunktionalen Linkers modifiziert werden, so dass auf der Oberfläche

eine monomolekulare Schicht beliebiger Moleküle entsteht, die, bevorzugt endständig, eine reaktive Gruppe enthalten. Unter dem Begriff "bifunktionaler Linker" wird jedes Molekül beliebiger Kettenlänge, insbesondere der Kettenlängen 2-14, mit zwei gleichen (homo-bifunktional) oder zwei verschiedenen (hetero-bifunktional) reaktiven Molekül-
5 Gruppen verstanden.

Sollen mehrere verschiedene Test-Sites auf der Oberfläche durch Ausnutzen der Methodik der Photolithographie gebildet werden, so ist mindestens eine der reaktiven Gruppen des homo- oder hetero-bifunktionalen Linkers eine photoinduzierbar reaktive
10 Gruppe, d. h. eine erst durch Lichteinstrahlung bestimmter oder beliebiger Wellenlänge reaktiv werdende Gruppe. Dieser Linker wird so aufgebracht, dass die/eine photoaktivierbare reaktive Gruppe nach der kovalenten Anbindung des Linkers auf der Oberfläche zur Verfügung steht. An die so modifizierte Oberfläche werden die Nukleinsäure-Oligomere kovalent angebunden, wobei diese selbst über einen Spacer
15 beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, mit einer reaktiven Gruppe modifiziert sind, bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers. Bei der reaktiven Gruppe des Oligonukleotids handelt es sich um Gruppen, die direkt (oder indirekt) mit der modifizierten Oberfläche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren. Daneben kann an die Nukleinsäure-
20 Oligomere in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die katalytisch redoxaktive
25 Gruppe, an diesem zweiten Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

b) Das Nukleinsäure-Oligomer, das auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht werden soll, ist über einen kovalent angebundenen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, mit einer oder mehreren reaktiven
30 Gruppen modifiziert, wobei sich die reaktive Gruppen bevorzugt in der Nähe eines Endes des Nukleinsäure-Oligomers befindet. Bei den reaktiven Gruppen handelt es sich um Gruppen, die direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren können. Beispiele hierfür sind: (i) Thiol- (HS-) oder Disulfid- (S-S-) derivatisierte Nukleinsäure-Oligomere der allgemeinen Formel (n x HS-Spacer)-oligo, (n x R-S-S-Spacer)-oligo
35 oder oligo-Spacer-S-S-Spacer-oligo, die mit einer Goldoberfläche unter Ausbildung von Gold-Schwefelbindungen reagieren oder (ii) Amine, die sich durch Chemi- oder Physisorption an Platin- oder Silizium-Oberflächen anlagern. Daneben kann an die Nukleinsäure-Oligomere in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt

oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die katalytisch redoxaktive Einheit (komplett oder Bestandteile davon) alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem zweiten Ende des Oligonukleotids angebunden sein. Insbesondere Nukleinsäure-Oligomere die mit mehreren Spacer-verbrückten Thiol oder Disulfidbrücken modifiziert sind ((n x HS-Spacer)-oligo bzw. (n x R-S-S-Spacer)-oligo) haben den Vorteil, dass solche Nukleinsäure-Oligomere unter einem bestimmten Anstellwinkel gegen die leitfähige Oberfläche (Winkel zwischen der Oberflächennormalen und der Helixachse eines doppelsträngigen helikalen Nukleinsäure-Oligomers bzw. zwischen der Oberflächennormalen und der Achse senkrecht zu den Basenpaaren eines doppelsträngigen nicht-helikalen Nukleinsäure-Oligomers) aufgebracht werden können, wenn die die Thiol- bzw. Disulfid-Funktionen an das Nukleinsäure-Oligomer anbindenden Spacer, von einem Ende der Nukleinsäure her betrachtet, eine zunehmende bzw. abnehmende Kettenlänge besitzen.

c) Als reaktive Gruppe am Sonden-Nukleinsäure-Oligomer werden die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen des Oligonukleotid-Rückgrats, insbesondere endständige Gruppen, verwendet. Die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen weisen eine erhöhte Reaktivität auf und gehen daher leicht typische Reaktionen wie z. B. Amidbildung mit (primären oder sekundären) Amino- bzw. Säuregruppen, Esterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Alkoholen bzw. Säuregruppen, Thioesterbildung mit (primären, sekundären oder tertiären) Thio-Alkoholen bzw. Säuregruppen oder die Kondensation von Amin und Aldehyd mit anschließender Reduktion der entstandenen CH=N Bindung zur $\text{CH}_2\text{-NH}$ Bindung ein. Die nötige Kopplungs-Gruppe zur kovalenten Anbindung an die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe ist in diesem Fall ein Teil der Oberflächenderivatisierung mit einer (monomolekularen) Schicht beliebiger Moleküllänge, wie unter a) in diesem Abschnitt beschrieben, oder die Phosphorsäure-, Zucker-C-3-Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe kann direkt mit der unmodifizierten Oberfläche reagieren, wie unter b) in diesem Abschnitt beschrieben. Daneben kann an die Oligonukleotide in der Nähe ihres zweiten Endes eine weitere reaktive Gruppe gebunden sein, wobei diese reaktive Gruppe wiederum, wie oben beschrieben, direkt oder über einen Spacer beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge, insbesondere der Kettenlänge 1 - 14, angebunden ist. Desweiteren kann die katalytisch redoxaktive Einheit (komplett oder Bestandteile davon), alternativ zu dieser weiteren reaktiven Gruppe, an diesem zweiten Ende des Nukleinsäure-Oligomers angebunden sein.

Die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche kann vor oder nach der Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer erfolgen. Im Falle eines redoxaktiven Proteins/Enzyms aus Apoprotein und Cofaktor(en) kann statt der kompletten katalytisch redoxaktiven Einheit auch nur das Apoprotein, das Apoprotein mit einem Teil der Cofaktoren oder ein oder mehrere der Cofaktoren angebunden sein und die katalytisch redoxaktive Einheit wird durch anschließende Rekonstitution mit den noch fehlenden Teilen komplettiert. Bei der Verwendung eines verknüpften (wenigstens bimolekularen) Elektron-Donor-/Elektron-Akzeptor-Komplexes als redoxaktive Einheit kann der Elektron-Akzeptor (bzw. -Donor), wie unter b) oder c) im Abschnitt "Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben, an eine oder statt einer terminalen Base an das Nukleinsäure-Oligomer gebunden sein und der Elektron-Donor (bzw. -Akzeptor) durch anschließende kovalente Anbindung an eine reaktive Gruppe des Elektron-Akzeptors (oder -Donors) angebunden werden oder, wie unter a) im Abschnitt "Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben, durch anschließende Anbindung an eine terminale reaktive Gruppe des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats am selben Ende (siehe auch den Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung"). Alternativ kann die Bindung des Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche vor oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der katalytisch redoxaktiven Einheit erfolgen. Die Bindung des bereits modifizierten Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche, d. h. die Bindung an die Oberfläche nach der Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit an das Nukleinsäure-Oligomer bzw. nach der Anbindung von Teilen der katalytisch redoxaktiven Einheit oder nach Anbinden des mit einer reaktiven Gruppe versehenen Spacers zur Bindung der katalytisch redoxaktiven Einheit, erfolgt ebenfalls wie unter a) bis c) in diesem Abschnitt beschrieben.

Bei der Herstellung der Test-Sites muß bei der Anbindung der Einzelstrang-Nukleinsäure-Oligomere an die Oberfläche darauf geachtet werden, dass zwischen den einzelnen Nukleinsäure-Oligomeren ein genügend großer Abstand verbleibt, um zum einen den für eine Hybridisierung mit dem Target-Nukleinsäure-Oligomer nötigen Freiraum und zum anderen den für die Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit nötigen Freiraum zur Verfügung zu stellen. Dazu bieten sich insbesondere drei verschiedene Vorgehensweisen (und Kombinationen daraus) an:

- 1.) Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines hybridisierten Nukleinsäure-Oligomers, also eine Oberflächen-Derivatisierung mit hybridisiertem Sonden-Nukleinsäure-Oligomer statt mit Einzelstrang-Sonden-Oligonukleotid. Der zur Hybridisierung verwendete Nukleinsäure-Oligomer-Strang ist unmodifiziert (die

Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a) - c) in diesem Abschnitt beschrieben). Anschließend wird der hybridisierte Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang thermisch dehybridisiert, wodurch eine mit Einzelstrang- Nukleinsäure-Oligomer modifizierte Oberfläche mit größerem Abstand zwischen den Sonden-Nukleinsäure-
5 Oligomeren hergestellt wird.

2.) Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomers, wobei während der Oberflächen-
Derivatisierung ein geeigneter monofunktionaler Linker zugesetzt wird, der neben dem
10 Einzelstrang- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer ebenfalls an die Oberfläche gebunden wird (die Oberflächenanbindung wird durchgeführt wie unter a) - c) in diesem Abschnitt beschrieben). Erfindungsgemäß hat der monofunktionale Linker eine Kettenlänge, die der Kettenlänge des Spacers zwischen der Oberfläche und dem Nukleinsäure-Oligomer identisch ist oder um maximal vier Kettenatome abweicht. Bei
15 der Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer zur Oberflächen-Derivatisierung wird der Nukleinsäure-Oligomer-Doppelstrang nach der gemeinsamen Anbindung des Doppelstrang- Nukleinsäure-Oligomers und des Linkers an die Oberfläche thermisch dehybridisiert. Durch die gleichzeitige Anbindung eines Linkers an die Oberfläche wird der Abstand zwischen den ebenfalls an die Oberfläche
20 gebundenen Einzel- oder Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomeren vergrößert. Im Falle der Verwendung von Doppelstrang-Nukleinsäure-Oligomer wird dieser Effekt durch die anschließende thermische Dehybridisierung noch verstärkt.

3.) Herstellung einer modifizierten Oberfläche durch Anbindung eines Einzelstrang- oder Doppelstrang-Oligonukleotids, an das die katalytisch redoxaktive Einheit bereits
angebunden ist, wobei die katalytisch redoxaktive Einheit einen Durchmesser von größer als 30 Å aufweist. Bei der Verwendung von Doppelstrang-Oligonukleotid wird
der Oligonukleotid-Doppelstrang nach der Anbindung des Doppelstrang-Oligonukleotids
30 an die Oberfläche thermisch dehybridisiert.

Im Bezug auf die einzelnen Schritte zur "Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" als auch zur "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche" sei darauf verwiesen, dass im Abschnitt "Wege zur Ausführung
35 der Erfindung" die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte, die zum selben Endergebnis führen, an einem Beispiel demonstriert sind (Figur 2).

Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden

Vorteilhafterweise werden gemäß dem Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäure-Oligomer-Hybriden mehrere Sonden-Nukleinsäure-Oligomere unterschiedlicher Sequenz, bei der de novo Sequenzierung idealerweise alle nötigen Kombinationen des Nukleinsäure-Oligomers, auf einem Oligomer (DNA)-Chip aufgebracht, um die Sequenz eines beliebigen Target-Nukleinsäure-Oligomers oder einer (fragmentierten) Target-DNA zu detektieren bzw. um Mutationen im Target aufzuspüren und sequenzspezifisch nachzuweisen oder um das Vorhandensein bekannter Gene bzw. bekannter Nukleinsäure-Oligomere zu detektieren.

Dazu wird ein Array aus Mikroelektroden verwendet, das entweder aus Elektroden besteht, die einzeln und direkt an eine Strom/Spannungsquelle angeschlossen sind oder es wird ein Elektroden-Array durch Mikrostrukturierung auf einer gemeinsamen Oberfläche aufgebracht, bei dem die einzelnen Elektroden über CMOS-Technologie angesteuert und ausgelesen werden können. Auf der leitfähigen Oberfläche der Einzelelektroden (einer Test-Site) werden die Oberflächenatome oder -moleküle mit DNA-/RNA-/PNA-Nukleinsäure-Oligomeren bekannter, aber beliebiger Sequenz, wie oben beschrieben, verknüpft. In einer allgemeinsten Ausführungsform kann aber auch eine einzige Elektrode mit einem einzigen Sonden-Oligonukleotid bzw. einer einzigen Sorte von Sonden-Oligonukleotiden (mit gleicher Basensequenz und mit gleicher katalytisch redoxaktiver Einheit) derivatisiert werden. Als Sonden-Nukleinsäure-Oligomere werden Nukleinsäure-Oligomere (z. B. DNA-, RNA- oder PNA-Fragmente) der Basenlänge 3 bis 50, bevorzugt der Länge 5 bis 30, besonders bevorzugt der Länge 8 bis 25 verwendet. Erfindungsgemäß wird oder ist an die Sonden-Nukleinsäure-Oligomere, wie nachfolgend beschrieben, eine katalytisch redoxaktive Einheit gebunden.

Desweiteren kann eine parallele Detektion von Hybridisierungsereignissen auch dadurch erreicht werden, dass entweder beim Aufbau der verschiedenen funktionalisierten Elektroden eines Elektroden-Arrays verschiedene katalytisch redoxaktive Einheiten für die einzelnen Elektroden des Arrays verwendet werden oder dass eine durchgängig leitfähige Oberfläche zum Aufbau der funktionalisierten Elektroden verwendet wird und die Unterscheidbarkeit molekularer Strukturen auf einem bestimmten Bereich mit identischem Elektrodenaufbau (eines bestimmten Test-Sites) innerhalb des Gesamtsystems (des kompletten Oligomer-Chips) dadurch erreicht wird, dass für die einzelnen Test-Sites verschiedene katalytisch redoxaktive Einheiten verwendet werden, die über die selektive Zugabe des jeweiligen spezifischen Substrats angesprochen werden können. Bei letzterer Variante wird aufgrund der durchgängigen

leitfähigen Oberfläche die elektrochemische Antwort des gesamten Oligomerchips detektiert, die Adressierung und das Auslesen der elektrochemischen Antwort einzelner Testsites erfolgt durch die selektive Zugabe des jeweils für dieses Test-Site spezifischen Substrats.

5

Die Modifikation der Sonden-Nukleinsäure-Oligomere mit einer katalytisch redoxaktiven Einheit kann komplett oder in Bestandteilen der katalytisch redoxaktiven Einheit entweder vor oder nach der Bindung des Sonden-Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche erfolgen. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte (Reaktionssequenzen), sind mit Hilfe der Figur 2 am Beispiel einer über ein Sonden-Oligonukleotid an eine Elektrode gebundenen katalytisch redoxaktiven Einheit im Abschnitt "Wege zur Ausführung der Erfindung" demonstriert.

10

Unabhängig von der jeweiligen Reaktionssequenz entsteht ein Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit, wobei "Einheit" repräsentativ für die katalytisch redoxaktive Einheit steht. Die Verbrückungen können natürlich auch ohne Spacer oder mit nur einem Spacer (Elek-ss-oligo-Spacer-Einheit bzw. Elek-Spacer-ss-oligo-Einheit) durchgeführt werden. Im Beispiel der Figur 2 ist die Einheit die Glucoseoxidase (GOx), ein redoxaktives Enzym bestehend aus Apoprotein und Cofaktor. Im Beispiel der Figur 2, 3a und 4 ist die GOx über seinen Cofaktor Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) in der sogenannten FAD-Protein-Bindungstasche der GOx kovalent mit dem Nukleinsäure-Oligomer verbunden. Die GOx bildet mit dem Cofaktor FAD einen 1:1 Komplex, wobei die GOx in seiner natürlichen Form als Homodimer vorkommt, aber auch in seiner erfindungsrelevanten Erscheinungsform als Monomer katalytische Aktivität aufweist. Im Beispiel der Figur 5a und 6 ist die Einheit Lactatdehydrogenase, ein NAD^+ -abhängiges Enzym, das durch nichtkovalente Wechselwirkung mit dem kovalent an das Sonden-Oligonukleotid gebundene (modifizierte) NAD^+ assoziiert.

15

20

25

Die elektrochemische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Oberfläche und der über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten katalytisch redoxaktiven Einheit ("Einheit") in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist schwach oder gar nicht vorhanden.

30

35

In einem nächsten Schritt werden die Test-Sites mit der zu untersuchenden Nukleinsäure-Oligomer-Lösung (Target) in Kontakt gebracht. Dabei kommt es nur in dem Fall zur Hybridisierung, in dem die Lösung Nukleinsäure-Oligomer-Stränge enthält, die zu den an die leitfähige Oberfläche gebundenen Sonden-Nukleinsäure-Oligomeren komplementär, oder zumindest in weiten Bereichen komplementär sind. Im Falle der

Hybridisierung zwischen Sonden- und Target-Nukleinsäure-Oligomer kommt es zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Oberfläche und der katalytisch redoxaktiven Einheit, da diese nunmehr über das aus einem Doppelstrang bestehende Nukleinsäure-Oligomer verbrückt ist. Die Figuren 3a bis 3c zeigen dies schematisch am Beispiel der Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-FAD(GOx). In Figur 4 ist die Sequenz der Elektron-Transfer-Schritte in Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-FAD(GOx) im Detail gezeigt, während Figur 5a das Beispiel Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD⁺-LDH schematisch zeigt und Figur 6 die Sequenz der Elektron-Transfer-Schritte in Elek-Spacer-ds-oligo-NAD⁺-LDH im Detail darstellt.

Aufgrund der Hybridisierung von Sonden-Nukleinsäure-Oligomer und dem dazu komplementären Nukleinsäure-Oligomer-Strang (Target) verändert sich die elektrische Kommunikation zwischen der (leitfähigen) Oberfläche und der katalytisch redoxaktiven Einheit. Somit kann ein sequenzspezifisches Hybridisierungsereignis durch elektrochemische Verfahren wie z. B. Cyclovoltametrie, Amperometrie, Potentiometrie oder Leitfähigkeitsmessungen detektiert werden.

Bei der Cyclovoltametrie wird das Potential einer stationären Arbeitselektrode zeitabhängig linear verändert. Ausgehend von einem Potential bei dem keine Elektrooxidation oder -reduktion stattfindet, wird das Potential solange verändert bis die redoxaktive Substanz oxidiert oder reduziert wird (also Strom fließt). Nach Durchlaufen des Oxidations- bzw. Reduktionsvorgangs, der in der Strom/Spannungskurve einen zunächst ansteigenden Strom, dann einen Maximalstrom (Peak) und schließlich einen allmählich abfallenden Strom erzeugt, wird die Richtung des Potentialvorschubs umgekehrt. Im Rücklauf wird dann das Verhalten der Produkte der Elektrooxidation oder -reduktion aufgezeichnet.

Eine alternative elektrische Detektionsmethode, die Amperometrie, wird dadurch ermöglicht, dass die katalytisch redoxaktive Einheit durch Anlegen eines geeigneten, konstant gehaltenen Elektrodenpotentials zwar elektrooxidiert (elektroreduziert) werden kann, die Rereduktion (Reoxidation) der katalytisch redoxaktiven Einheit in den ursprünglichen Zustand aber nicht wie in der Cyclovoltametrie durch Änderung des Elektrodenpotentials erfolgt, sondern durch ein der Targetlösung zugesetztes geeignetes Reduktionsmittel (Oxidationsmittel), der "redoxaktiven Substanz", wodurch der Stromkreis des Gesamtsystems geschlossen wird. Solange solches Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) vorhanden ist bzw. solange das verbrauchte Reduktionsmittel (Oxidationsmittel) an der Gegenelektrode rereduziert (reoxidiert) wird, fließt Strom, der amperometrisch detektiert werden kann und der proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse ist.

- Dieses Prinzip der amperometrischen Detektion soll am Beispiel der Glucoseoxidase näher erläutert werden (vgl. auch Figur 3a bis 3c und 4). Das mit einem Ende kovalent an die Elektrode angebundene Sonden-Oligonukleotid kann am anderen, noch freien Ende mit der vollständigen enzymatischen Einheit der Glucoseoxidase funktionalisiert werden, indem z. B. der Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD)-Cofaktor des Enzyms kovalent an das Sonden-Oligonukleotid angebunden wird und anschließend mit dem Glucoseoxidase-Apoprotein (GOx) rekonstituiert wird. Das entstandene Oberflächen-Hybrid der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-FAD(GOx) weist zwischen Elektrode und FAD keine oder nur geringe Leitfähigkeit auf. Im Falle der Hybridisierung mit dem zu "ss-oligo" komplementären Target-Oligonukleotid wird die Leitfähigkeit deutlich erhöht. Bei Zusatz des Substrats Glucose zur Target-Oligonukleotid-Lösung wird das FAD der Glucoseoxidase (FAD(GOx)) zu FADH_2 der Glucoseoxidase ($\text{FADH}_2(\text{GOx})$) reduziert, wobei Glucose zur Gluconsäure oxidiert wird. Liegt nun an der Elektrode ein geeignetes äußeres Potential an, so dass über das hybridisierte Oligonukleotid Elektronen von $\text{FADH}_2(\text{GOx})$ an die Elektrode abgegeben werden und somit $\text{FADH}_2(\text{GOx})$ zu $\text{FAD}(\text{GOx})$ reoxidiert wird (aber weder Glucose noch Gluconsäure bei diesem Potential elektrooxidiert oder -reduziert werden kann), fließt im System Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-FAD(GOx) solange Strom wie $\text{FAD}(\text{GOx})$ durch freie Glucose reduziert wird, d. h. bis die gesamte Glucose verbraucht ist bzw. für den Fall, dass an der Gegenelektrode ein Potential anliegt, bei dem Gluconsäure zu Glucose reduziert werden kann, solange wie Gluconsäure an der Gegenelektrode reduziert wird. Dieser Strom kann amperometrisch detektiert werden und ist proportional zur Zahl der Hybridisierungsereignisse.
- Bei der potentiometrischen Detektion von Hybridisierungsereignissen wird der Verlauf des Elektrodenpotentials in Abhängigkeit vom z. B. dem Substratverbrauch aufgezeichnet. Hierbei wird z. B. das Potential einer stationären Arbeitselektrode auf das "zero current" Potential E^0 des Substrats eingestellt. Bei Verbrauch von Substrat durch die katalytisch redoxaktive Einheit (im Falle der Hybridisierung) ändert sich das "zero current" Potential E^0 in Richtung des Gleichgewichtspotentials E^{eq} . Somit erhält man durch die Aufzeichnung des Potentials in Abhängigkeit von der Zeit (\sim Substratverbrauch) Aufschluß über den Hybridisierungszustand.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen im Zusammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Es zeigen

5

Fig. 1	Schematische Darstellung der Oligonukleotid-Sequenzierung durch Hybridisierung auf einem Chip;
Fig. 2	Verschiedene Reaktionssequenzen zur Herstellung des Oberflächenhybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx). Die katalytisch redoxaktive Einheit in diesem Oberflächenhybrid ist die Glucoseoxidase (GOx) bestehend aus Apoprotein und Flavin-Adenin-Dinukleotid- (FAD-) Cofaktor. Die GOx ist über ihren Cofaktor FAD kovalent über PQQ und einen Spacer mit dem Oligonukleotid verbunden;
Fig. 3a-3c	Schematische Darstellung der amperometrischen Meßmethode am Beispiel des Oberflächen-Hybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx) aus Figur 2 (Inj.: Zugabe (Injektion) des Substrats Glucose);
Fig. 4	Detaillierte schematische Darstellung des Oberflächenhybrids Au-S(CH ₂) ₂ -ds-oligo-Spacer-FAD(GOx) der Figur 3a mit Gold als Oberflächenmaterial, Mercaptoethanol als Spacer (-S-CH ₂ CH ₂ - Spacer) zwischen Elektrode und Oligonukleotid und -CH ₂ -CH=CH-CO-NH-CH ₂ -CH ₂ -NH-PQQ-NH-CH ₂ -CH ₂ - als Spacer zwischen dem Cofaktor FAD und Oligonukleotid sowie die Darstellung der Sequenz der durch das Substrat induzierten Elektron-Transfer-Schritte. Das Apoprotein des GOx ist nur als Hülle (durchgezogene Linie) angedeutet (vgl. Figur 7). Das 12 Bp Sonden-Oligonukleotid der exemplarischen Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' ist, als Ausschnitt, im hybridisierten Zustand gezeigt;
Fig. 5	Schematische Darstellung der amperometrischen Meßmethode am Beispiel des Oberflächen-Hybrids Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD ⁺ -LDH (Inj.: Zugabe (Injektion) des Substrats Lactat);
Fig. 6	Detaillierte schematische Darstellung des Oberflächenhybrids Au-S(CH ₂) ₂ -ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD ⁺ -LDH der Figur 3a mit Gold als Oberflächenmaterial, Mercaptoethanol als Spacer (-S-CH ₂ CH ₂ - Spacer)

	zwischen Elektrode und Oligonukleotid und $-\text{CH}_2\text{-CH=CH-CO-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-PQQ-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ als Spacer zwischen dem NAD^+ und Oligonukleotid an das ADH assoziiert ist sowie die Darstellung der Sequenz der durch das Substrat induzierten Elektron-Transfer-Schritte. Das 12 bp Sonden-Oligonukleotid der exemplarischen Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' ist, als Ausschnitt, im hybridisierten Zustand gezeigt;
Fig. 7	Monomer der Glucoseoxidase (GOx). Das Apoprotein besteht aus α -helikalen und β -Faltblatt Domänen, das Coenzym Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) ist in Form des raumfüllenden Schalottenmodells eingezeichnet. Die Struktur des FAD ist in Formel 1 gezeigt. In seiner nativen Erscheinungsform liegt die GOx als Homodimer vor.

Wege zur Ausführung der Erfindung

- 5 Eine Bildungseinheit einer exemplarischen Test-Site mit hybridisiertem Target, Au-S(CH₂)₂-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx) der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ds-oligo-Spacer-Einheit ist in Figur 4 dargestellt. Unter Bildungseinheit wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung die kleinste sich wiederholende Einheit einer Test-Site bzw. einer funktionalisierten Elektrode innerhalb des Elektroden-Arrays verstanden. In dem
- 10 Beispiel der Figur 4 ist die Oberfläche eine Gold-Elektrode. Die Verbindung zwischen Gold-Elektrode und Sonden-Oligonukleotid wurde mit dem Linker (HO-(CH₂)₂-S)₂ aufgebaut, der mit der endständigen Phosphatgruppe am 3' Ende zu P-O-(CH₂)₂-S-S-(CH₂)₂-OH verestert wurde und nach homolytischer Spaltung der S-S Bindung an der Gold-Oberfläche je eine Au-S Bindung bewirkte, womit 2-Hydroxy-mercaptoethanol und
- 15 Mercaptoethanol-verbrücktes Oligonukleotid auf der Oberfläche koadsorbiert wurde. Die katalytisch redoxaktive Einheit im Beispiel der Figur 4 ist die Glucoseoxidase (GOx), ein redoxaktives Enzym bestehend aus Apoprotein und FAD-Cofaktor(en). Im Anwendungsbeispiel ist die GOx über seinen FAD-Cofaktor kovalent mit dem Oligonukleotid verbunden, wobei zuerst freies FAD mit einer reaktiven Amino-Gruppe
- 20 versehen wurde (siehe Beispiel 1), dann freies FAD über diese Amino-Gruppe kovalent an das Sonden-Oligonukleotid angebunden wurde (Amidbildung unter Wasserabspaltung mit einer Carbonsäure-Gruppe des PQQ, das mit einer anderen Carbonsäure-Gruppe an die terminalen Aminofunktion des -CH=CH-CO-NH-CH₂-CH₂-NH₂ Linkers an der C-5-Position des 5'-Thymins des Sondenoligonukleotids gebunden
- 25 ist) und schließlich das Apoprotein der GOx an FAD rekonstituiert wurde.

Wie weiter oben bereits erwähnt, kann die Modifikation der Sonden-Oligonukleotide mit der kompletten oder mit einem Bestandteil der katalytisch redoxaktiven Einheit entweder vor oder nach der Bindung des Sonden-Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche erfolgen. Die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Schritte, die prinzipiell zur selben Bildungseinheit einer Test-Site bzw. einer funktionalisierten Elektrode innerhalb des Elektroden-Arrays führen, sollen im folgenden mit Hilfe der Figur 2 am Beispiel des Oberflächenhybrids $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$ bzw. in seiner allgemeineren Form als Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx) dargestellt werden.

Die GOx kann durch einfache Manipulation vom FAD-Cofaktor befreit werden (vgl. Beispiel 4), so dass man GOx in zwei Bestandteile, FAD und Apoprotein, zerlegen kann. Das Sonden-Oligonukleotid ist in der Nähe der beiden Enden jeweils über einen (beliebigen) Spacer mit (gleichen oder verschiedenen) reaktiven Gruppe versehen. In einer Reaktionssequenz "1" kann das so modifizierte Sonden-Oligonukleotid in Gegenwart eines monofunktionalen Linkers (entsprechend den Punkten a) - c) und 2.) im Abschnitt "Bindung eines Oligonukleotids an die leitfähige Oberfläche") gemeinsam mit dem monofunktionalen Linker kovalent an die Elektrode angebunden werden, wobei darauf geachtet wird, dass genügend monofunktionaler Linker geeigneter Kettenlänge zugesetzt wird, um zwischen den einzelnen Sonden-Oligonukleotiden genügend Freiraum für eine Hybridisierung mit dem Target-Oligonukleotid und für die Anbindung der katalytisch redoxaktiven Einheit zur Verfügung zu stellen. Danach wird an die freie, spacerverbrückte, reaktive Gruppe des Sonden-Oligonukleotids PQQ und daran $\text{N}^6\text{-(2-Aminoethyl)-FAD}$ (Formel 5 bzw. Beispiel 1) gebunden. Die Anbindung erfolgt wie unter a) bzw. b) im Abschnitt "Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" bzw. in Beispiel 4 beschrieben. Im letzten Schritt dieser Reaktionssequenz "1" wird dann das Apoprotein der GOx wie in Beispiel 2 beschrieben an den (modifizierten) FAD-Cofaktor rekonstituiert. In einer Variante dazu (Reaktionssequenz "2") kann das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Sonden-Oligonukleotid zuerst ohne freien, monofunktionalen Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode gebunden werden, wobei es zu einer flachen Anlagerung des Oligonukleotids kommt. Danach wird der freie, monofunktionale Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode gebunden. Eine weitere Möglichkeit (Reaktionssequenz "3") besteht darin, das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Sonden-Oligonukleotid zuerst mit PQQ und FAD zu modifizieren, dann in Gegenwart von freiem, monofunktionalen Linker (Spacer) kovalent an die Elektrode anzubinden und anschließend mit dem GOx-Apoprotein zu rekonstituieren. Schließlich kann in einer Reaktionssequenz "4" das (mit Spacer und reaktiven Gruppen) modifizierte Sonden-

Oligonukleotid zuerst mit PQQ und FAD modifiziert werden, um es dann mit dem GOx-Apoprotein zu rekonstituieren und anschließend kovalent an die Elektrode zu binden. Falls, wie im Fall der GOx, die katalytisch redoxaktive Einheit einen wesentlich größeren Durchmesser aufweist als das hybridisierte ds-Oligonukleotid (größer als 30 Å), kann auf die kovalente Anbindung eines geeigneten freien, monofunktionalen Linkers (Spacers) an die Elektrode verzichtet werden, anderenfalls geschieht die Anbindung der Struktur -Spacer-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx) an die Elektrode in Gegenwart eines geeigneten, freien monofunktionalen Linkers.

- 10 Im Beispiel der Figur 2 ist die GOx über den FAD-Cofaktor kovalent mit dem Oligonukleotid verbunden. Alternativ kann statt des FAD-Cofaktors auch das Apoprotein kovalent an das Sonden-Oligonukleotid angebunden werden, es können beliebige Kombinationen der Reaktionssequenzen "1", "2", "3" oder "4" in Figur 2 angewandt werden, solange sie zum gleichen Endprodukt führen (vgl. Figur 2) und es kann in beliebigen Reaktionsschritten statt des Einzelstrang-Sonden-Oligonukleotids das mit komplementären, unmodifizierten (Target-)Oligonukleotid hybridisierte Sonden-Oligonukleotid verwendet werden. Das Sonden-Oligonukleotid kann auch direkt, also nicht über einen Spacer verbrückt, sowohl an die Elektrode als auch an die katalytisch redoxaktive Einheit angebunden werden, wie unter c) im Abschnitt "Bindung eines Nukleinsäure-Oligomers an die leitfähige Oberfläche" bzw. a) im Abschnitt "Bindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit an ein Nukleinsäure-Oligomer" beschrieben.

Die elektrische Kommunikation zwischen der leitfähigen Oberfläche und der über ein Einzelstrang-Oligonukleotid verbrückten katalytisch redoxaktiven Einheit in der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist schwach oder gar nicht vorhanden. Durch Behandlung der Test-Site(s) mit einer zu untersuchenden Oligonukleotid-Lösung, kommt es, im Falle der Hybridisierung zwischen Sonde und Target, zu einer verstärkten Leitfähigkeit zwischen der Oberfläche und der über ein Doppelstrang-Oligonukleotid verbrückten katalytisch redoxaktiven Einheit. Für die Bildungseinheit der exemplarische Test-Site $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$ (mit 12-Bp Sonden-Oligonukleotiden) ist dies schematisch in Figur 3c anhand amperometrischer Messungen gezeigt.

Durch Zugabe von Glucose werden Elektronen auf den FAD-Cofaktor der GOx übertragen. Liegt an der Elektrode ein geeignetes Potential an, um vom reduzierten FAD (FAD^- bzw. FAD^{2-} bzw. FADH_2) Elektronen auf die Elektrode zu übertragen, kommt es im Falle des nicht mit Target-Oligonukleotid hybridisierten Sonden-Oligonukleotids trotzdem zu keinem Stromfluß, da die Leitfähigkeit des ss-Oligonukleotids in $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$ sehr gering oder

- überhaupt nicht vorhanden ist. Im hybridisierten Zustand ($\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$) jedoch ist die Leitfähigkeit hoch, Elektronen können vom reduzierten FAD (FAD^- bzw. FAD^{2-} bzw. FADH_2) zur Elektrode übertragen werden (unter Bildung von FAD). Dies äußert sich amperometrisch in einem deutlichen Stromfluß zwischen
- 5 Elektrode und katalytisch redoxaktiver Einheit (Figur 3c). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Sonden-Oligonukleotiden durch Amperometrie zu detektieren. Die einzelnen Elektron Transfer Schritte, die im Oberflächenhybrid $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$ durch das Substrat ausgelöst werden, sind in Figur 4 dargestellt. Prinzipiell kann das Oberflächenhybrid
- 10 $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx)}$ unter geeigneten äußeren Umständen auch umgekehrt geschaltet werden, so dass FAD von der Elektrode reduziert wird und reduziertes FAD (FAD^- bzw. FAD^{2-} bzw. FADH_2) von einem geeigneten Substrat in einer katalytischen Reaktion oxidiert wird.
- 15 Ein weiteres Test-Site bzw. eine weitere funktionalisierte Elektrode innerhalb des Elektroden-Arrays, $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$, der allgemeinen Struktur Elek-Spacer-ss-oligo-Spacer-Einheit ist in Figur 5a dargestellt. Durch Zugabe des ADH-Substrats Lactat werden Elektronen auf den FMN-Cofaktor der LDH übertragen und von diesem reduzierten FMN (FMN^- bzw. FMN^{2-} bzw. FMNH_2) direkt
- 20 oder unter Beteiligung weiterer Cofaktoren der LDH auf NAD^+ weitergeleitet und schließlich vom reduzierten NAD^+ (NAD , NAD^- bzw. NADH) auf die Elektrode übertragen werden zu können. Im Falle des nicht mit Target-Oligonukleotid hybridisierten Sonden-Oligonukleotids kommt es trotzdem zu keinem Stromfluß zwischen reduziertem NAD^+ (NAD , NAD^- bzw. NADH) und Elektrode, da die
- 25 Leitfähigkeit des ss-Oligonukleotids in $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$ sehr gering oder überhaupt nicht vorhanden ist. Im hybridisierten Zustand ($\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$) jedoch ist die Leitfähigkeit hoch, Elektronen können vom reduzierten NAD^+ (NAD , NAD^- bzw. NADH) zur Elektrode übertragen werden (unter Bildung von NAD^+). Dies äußert sich amperometrisch in einem deutlichen
- 30 Stromfluß zwischen Elektrode und katalytisch redoxaktiver Einheit (Figur 5c). Damit ist es möglich, die sequenzspezifische Hybridisierung des Targets mit den Sonden-Oligonukleotiden durch Amperometrie zu detektieren. Die einzelnen Elektron Transfer Schritte, die im Oberflächenhybrid $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-ADH}$ durch das Substrat ausgelöst werden, sind in Figur 6 dargestellt. Prinzipiell kann das
- 35 Oberflächenhybrid $\text{Au-S(CH}_2)_2\text{-ds-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$ unter geeigneten äußeren Umständen auch umgekehrt geschaltet werden, so dass NAD^+ von der Elektrode reduziert wird und reduziertes NAD^+ (NAD , NAD^- bzw. NADH) von einem geeigneten Substrat (z. B. Acetaldehyd) in einer katalytischen Reaktion oxidiert wird.

Da die Redoxaktivität der katalytisch redoxaktiven Einheit - auch bei passendem Elektrodenpotential - erst durch Zugabe des spezifischen Substrats ausgelöst und maximal solange aufrechterhalten wird, wie Substrat vorhanden ist, kann dies erfindungsgemäß dadurch ausgenutzt werden, dass ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe eines Oligomer-Chips räumlich aufgelöst wird, indem verschiedene katalytisch redoxaktive Einheiten für die verschiedenen Test-Sites (bzw. Test-Site Gruppen) verwendet werden. Dies birgt den erfindungsgemäßen Vorteil, dass die verschiedenen Test-Sites (Nukleinsäure-Oligomer-Kombinationen) eines Oligomer-Chips auf eine gemeinsame, durchgängige, elektrisch leitende Oberfläche aufgebracht werden können und ein bestimmtes Test-Site oder eine bestimmte Test-Site-Gruppe einfach durch Zugabe der jeweiligen spezifische Substrate adressiert und amperometrisch detektiert werden kann. Die verschiedenen Test-Sites müssen also nicht auf einzelnen, elektrisch voneinander isolierten und zum Anlegen eines Potentials und Auslesen des Stroms einzeln ansteuerbaren (Mikro-) Elektroden aufgebracht werden.

Daneben können fehlerhafte Basenpaarungen (Basenpaar Mismatches) durch eine geänderte cyclovoltammetrische Charakteristik erkannt werden. Ein Mismatch äußert sich in einem größeren Potentialabstand zwischen den Strommaxima der Elektroreduktion und der Elektroreoxidation (Umkehrung der Elektroreduktion bei umgekehrter Potentialvorschubrichtung) bzw. der Elektrooxidation und Elektroreduktion in einem cyclovoltammetrisch reversiblen Elektronen-Transfer zwischen der elektrisch leitenden Oberfläche und der katalytisch redoxaktiven Einheit. Dieser Umstand wirkt sich vor allem in der amperometrischen Detektion günstig aus, da dort der Strom bei einem Potential getestet werden kann, bei dem zwar das perfekt hybridisierende Oligonukleotid-Target signifikant Strom liefert, nicht aber das fehlerhaft gepaarte Oligonukleotid-Target.

Beispiel 1: Modifikation des FAD zum N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD, Formel 5, bzw. des NAD^+ zum N^6 -(2-Aminoethyl)- NAD^+ : Die Darstellung von N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD erfolgt durch Alkylierung der N-1 Position der Adenin-Einheit von FAD mit Aziridin (Acacyclopropan) unter milden, wässrigen Bedingungen (pH = 3,2 - pH = 5,5) und anschließender intramolekularer Dimroth-Umlagerung unter milden wässrigen Bedingungen (pH = 6 - 6,5, 50 °C) entsprechend der Vorschrift in Bückmann et al., 1991, European Patent 0.247.537.B1. Alternativ kann auch die Methode von Morris et al. Anal. Chem. 53 (1991) 658 - 665 oder Zapelli et al. Eur. J. Biochem. 89 (1978) 491 - 499 angewandt werden. Unter gleichen Reaktionsbedingungen kann auch das N^6 -(2-Aminoethyl)- NAD^+ hergestellt werden, wenn statt FAD NAD^+ als Startsubstanz verwendet wird.

Beispiel 2: Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode $Au-S-(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx): Die Herstellung von $Au-S-(CH_2)_2$ -ss-oligo-Spacer-PQQ-FAD(GOx) gliedert sich in 5 Teilabschnitte, nämlich der Darstellung der leitfähigen Oberfläche, der Derivatisierung der Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid in Gegenwart eines geeigneten monofunktionalen Linkers (Inkubationsschritt), der kovalenten Anbindung des PQQ (Redoxschritt I), der Anbindung des N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD (Redoxschritt II) und der Rekonstitution des Apoproteins der GOx (Rekonstitutionsschritt).

Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide bildet ein ca. 100 nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen). Dazu wurde in einer elektrischen Entladungskammer frisch gespaltenes Mica mit einem Argon-Ionenplasma gereinigt und durch elektrische Entladung Gold (99.99%) in einer Schichtdicke von ca. 100nm aufgebracht. Anschließend wurde der Gold-Film mit 30 % H_2O_2 , / 70 % H_2SO_4 von Oberflächenverunreinigungen befreit (Oxidation organischer Ablagerungen) und für ca. 20 Minuten in Ethanol getaucht, um an der Oberfläche adsorbierten Sauerstoff zu verdrängen. Nach Abspülen der Oberfläche mit bidestilliertem Wasser wird auf die horizontal gelagerte Oberfläche eine vorher bereitete 1×10^{-4} molare Lösung des (modifizierten) Doppelstrang-Oligonukleotids aufgetragen, so dass die komplette Gold-Oberfläche benetzt wird (Inkubationsschritt, siehe auch unten).

Zur Inkubation wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3' Endes mit $(HO-(CH_2)_2-S)_2$ zum $P-O-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-OH$ verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base Thymin des Oligonukleotids am C-5 Kohlenstoff mit $-CH=CH-CO-NH-CH_2-CH_2-NH_2$ modifiziert. Zu einer 2×10^{-4} molaren Lösung dieses Oligonukleotids in HEPES-Puffer (0,1 molar in Wasser, pH 7.5 mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe Abkürzungen) wurde ca. 10^{-4} bis 10^{-1} molar 2-Hydroxy-mercaptoethanol gegeben (oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge) und die Gold-Oberfläche eines Test-Sites komplett benetzt und 2-24h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer $P-O-(CH_2)_2-S-S-(CH_2)_2-OH$ des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie 2-Hydroxy-mercaptoethanol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt).

Die so mit einer Monolayer aus ss-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und

anschließend mit einer Lösung von 3×10^{-3} molarem Chinon PQQ, 10^{-2} molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 - 4 h bilden der $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ Spacer und das PQQ eine kovalente Bindung (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-7-Carbonsäurefunktion des PQQ, Redoxschritt I).

Anschließend wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von $1-10 \times 10^{-3}$ molarem Chinon N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD, $1-5 \times 10^{-2}$ molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 - 4 h bilden PQQ und das N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD eine kovalente Bindung (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-2-Carbonsäurefunktion des an das Oligonukleotid gebundenen PQQ, Redoxschritt II)

Letztendlich wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von ca. 5×10^{-5} molarer FAD-freier GOx in 100 mM Phosphat-Puffer, pH = 7, mit 0.5 molarem Zusatz von TEATFB bei ca. 25 °C für ca. 4 h und danach ca. 12 h bei 4 °C inkubiert, um das Apoprotein der GOx an das Oligonukleotid-gebundene N^6 -(2-Aminoethyl)-FAD zu rekonstituieren und abschließend mit ca. 4 °C kalter Pufferlösung (100 mM Phosphat, pH = 7 mit 0.5 molarem Zusatz von TEATFB) gewaschen (Rekonstitutionsschritt).

Beispiel 3: Herstellung der Oligonukleotid-Elektrode $\text{Au-S-(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$: Die Herstellung von $\text{Au-S-(CH}_2)_2\text{-ss-oligo-Spacer-PQQ-NAD}^+\text{-LDH}$ gliedert sich in 5 Teilabschnitte, nämlich der Darstellung der leitfähigen Oberfläche, der Derivatisierung der Oberfläche mit dem Sonden-Oligonukleotid in Gegenwart eines geeigneten monofunktionalen Linkers (Inkubationsschritt), der kovalenten Anbindung des PQQ (Redoxschritt I), der Anbindung des N^6 -(2-Aminoethyl)- NAD^+ (Redoxschritt II) und der Assoziation mit LDH (Assoziationsschritt).

Das Trägermaterial für die kovalente Anbindung der Doppelstrang-Oligonukleotide bildet ein ca. 100 nm dünner Gold-Film auf Mica (Muskovit Plättchen). Dazu wurde in einer elektrischen Entladungskammer frisch gespaltenes Mica mit einem Argon-Ionenplasma gereinigt und durch elektrische Entladung Gold (99.99%) in einer Schichtdicke von ca. 100nm aufgebracht. Anschließend wurde der Gold-Film mit 30 % H_2O_2 , / 70 % H_2SO_4 von Oberflächenverunreinigungen befreit (Oxidation organischer Ablagerungen) und für ca. 20 Minuten in Ethanol getaucht, um an der Oberfläche adsorbierten Sauerstoff zu verdrängen. Nach Abspülen der Oberfläche mit bidestilliertem Wasser wird auf die horizontal gelagerte Oberfläche eine vorher bereitete 1×10^{-4} molare Lösung des (modifizierten) Doppelstrang-Oligonukleotids

aufgetragen, so dass die komplette Gold-Oberfläche benetzt wird (Inkubationsschritt, siehe auch unten).

- 5 Zur Inkubation wurde ein doppelt modifiziertes 12 Bp Einzelstrang-Oligonukleotid der Sequenz 5'-TAGTCGGAAGCA-3' verwendet, das an der Phosphatgruppe des 3' Endes mit $(\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{S})_2$ zum $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2-\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ verestert ist. Am 5'-Ende ist die endständige Base Thymin des Oligonukleotids am C-5 Kohlenstoff mit $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ modifiziert. Zu einer 2×10^{-4} molaren Lösung dieses Oligonukleotids in HEPES-Puffer (0,1 molar in Wasser, pH 7.5 mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB, siehe
- 10 Abkürzungen) wurde ca. 10^{-4} bis 10^{-1} molar 2-Hydroxy-mercaptoethanol gegeben (oder ein anderer Thiol- oder Disulfid-Linker geeigneter Kettenlänge) und die Gold-Oberfläche eines Test-Sites komplett benetzt und 2-24h inkubiert. Während dieser Reaktionszeit wird der Disulfidspacer $\text{P-O}-(\text{CH}_2)_2-\text{S-S}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ des Oligonukleotids homolytisch gespalten. Dabei bildet der Spacer mit Au-Atomen der Oberfläche eine
- 15 kovalente Au-S Bindung aus, wodurch es zu einer 1:1 Koadsorption des ss-Oligonukleotids und des abgespaltenen 2-Hydroxy-mercaptoethanols kommt. Das in der Inkubationslösung gleichzeitig anwesende, freie 2-Hydroxy-mercaptoethanol wird ebenfalls durch Ausbildung einer Au-S Bindung koadsorbiert (Inkubationsschritt).
- 20 Die so mit einer Monolayer aus ss-Oligonukleotid und 2-Hydroxy-mercaptoethanol modifizierte Goldelektrode wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit einer Lösung von 3×10^{-3} molarem Chinon PQQ, 10^{-2} molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 - 4 h bilden der $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ Spacer und das PQQ eine
- 25 kovalente Bindung (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-7-Carbonsäurefunktion des PQQ, Redoxschritt I).

- Anschließend wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von $1-10 \times 10^{-3}$ molarem Chinon N^6 -(2-Aminoethyl)-
- 30 NAD^+ , $1-5 \times 10^{-2}$ molarem EDC und 10^{-2} molarem sulfo-NHS in HEPES Puffer benetzt. Nach einer Reaktionszeit von ca. 1 - 4 h bilden PQQ und das N^6 -(2-Aminoethyl)- NAD^+ eine kovalente Bindung (Amidbildung zwischen der Aminogruppe des Spacers und der C-2-Carbonsäurefunktion des an das Oligonukleotid gebundenen PQQ, Redoxschritt II)

- 35 Letztendlich wurde die so modifizierte Goldelektrode mit bidestilliertem Wasser gewaschen und mit einer Lösung von LDH (5mg/mL) in 10 mM Tris, pH = 7, mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB bei ca. 4 °C für ca. 1 h inkubiert, um LDH an das Oligonukleotid-gebundene N^6 -(2-Aminoethyl)- NAD^+ zu assoziieren und abschließend mit

ca. 4 °C kalter Pufferlösung (10 mM Tris, pH = 7 mit 0.7 molarem Zusatz von TEATFB) gewaschen (Assoziationsschritt).

Beispiel 4: Darstellung des Apoproteins von Glucoseoxidase / Extraktion des FAD aus

- 5 **Glucoseoxidase:** Glucoseoxidase (GOx) in Phosphat-Puffer (80mg GOx in 14mL Puffer) mit Zusatz von 6mL Glycerin wird in einem Salz/Eisbad auf -4 °C abgekühlt, stark gerührt und allmählich mit 2,5 %iger H₂SO₄ (v/v) versetzt bis der pH-Wert auf pH = 1,4 sinkt und so 2.5 h auf dem Eisbad inkubiert. Anschließend wird das Apoprotein säulenchromatographisch erhalten. Dazu wird eine Sephadex G-50 Säule mit 30% Glycerin in Wasser (v/v) equilibriert und mit konz. H₂SO₄ auf pH = 1,4 gebracht, auf 4 °C gekühlt und die Inkubationslösung aufgetragen. Der Proteinpeak wird bei einer Flußrate von 1,3 mL/min eluiert und in einem Vorratsbehälter mit 0.4 molarem Phosphat-Puffer (4 mL mit Zusatz von 200mg Rinderserum-Albumin und 400mg Aktivkohle) aufgefangen (der Proteinpeak kann durch UV-Absorption des Eluats 10 erkannt werden). Das Protein enthaltende Eluat wird auf pH = 7 eingestellt und die Aktivkohle durch Filtration (0.8µm und anschließend 0.22 µm Millipore Filter) entfernt. Schließlich wird 10 %iges Natriumazid in Wasser (w/v) zugegeben bis die Gesamt-Konzentration des Natriumazids 0.1% (w/v) beträgt.

20

Neue Patentansprüche 1 - 29

1. Durch Anbindung einer katalytisch redoxaktiven Einheit modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytisch redoxaktive Einheit ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus nativer oder modifizierter Alkoholdehydrogenase, nativer oder modifizierter Fruktosedehydrogenase, nativer oder modifizierter Lactatdehydrogenase und nativen oder modifizierten Peroxidasen.
2. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytisch redoxaktive Einheit kovalent angebunden ist.
3. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer sequenzspezifisch Einzelstrang-DNA, RNA und/oder PNA binden kann.
4. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer ein Desoxyribonukleinsäure-, Ribonukleinsäure- oder ein Peptidnukleinsäure-Oligomer ist.
5. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytisch redoxaktive Einheit kovalent alternativ an eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppen oder an einen Zucker des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats gebunden ist.
6. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytisch redoxaktive Einheit nach Anbindung an das Nukleinsäure-Oligomer katalytische Aktivität besitzt.
7. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die katalytisch redoxaktive Einheit nach Anbindung an das Nukleinsäure-Oligomer elektrokatalytische Aktivität besitzt.

8. Modifiziertes Nukleinsäure-Oligomer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere katalytisch redoxaktive Einheiten an das Nukleinsäure-Oligomer angebunden sind.
9. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers wie in einem der vorhergehenden Ansprüche definiert, dadurch gekennzeichnet, dass eine katalytisch redoxaktive Einheit kovalent an ein Nukleinsäure-Oligomer angebunden wird.
10. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäure-Oligomer alternativ durch eine oder mehrere Amidbildungen mit Amin- oder mit Säure-Gruppen der katalytisch redoxaktiven Einheit, durch eine oder mehrere Esterbildungen mit Alkohol- oder mit Säure-Gruppen der katalytisch redoxaktiven Einheit, durch Thioesterbildung mit Thio-Alkohol- oder mit Säure-Gruppen der katalytisch redoxaktiven Einheit bzw. durch Kondensation einer oder mehrerer Amin-Gruppen des Nukleinsäure-Oligomers mit Aldehyd-Gruppen der katalytisch redoxaktiven Einheit und anschließender Reduktion der entstandenen Kohlenstoff-Stickstoff-Doppelbindung an die katalytisch redoxaktive Einheit gebunden wird.
11. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass an die katalytisch redoxaktive Einheit kovalent eine oder mehrere verzweigte oder unverzweigte Molekülteile beliebiger Zusammensetzung und Kettenlänge angebunden ist und die verzweigten oder unverzweigten Molekülteile alternativ eine reaktive Amin-, Hydroxy-, Thiol-, Säure- oder Aldehyd-Gruppe zur kovalenten Anbindung an ein Nukleinsäure-Oligomer besitzen.
12. Verfahren zur Herstellung eines modifizierten Nukleinsäure-Oligomers nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die kürzeste durchgehende Verbindung zwischen dem Nukleinsäure-Oligomer und der katalytisch redoxaktiven Einheit ein verzweigtes oder unverzweigtes Molekülteil mit einer Kettenlänge von 1 - 20 Atomen ist.
13. Modifizierte leitfähige Oberfläche, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 an eine leitfähige Oberfläche angebunden sind.

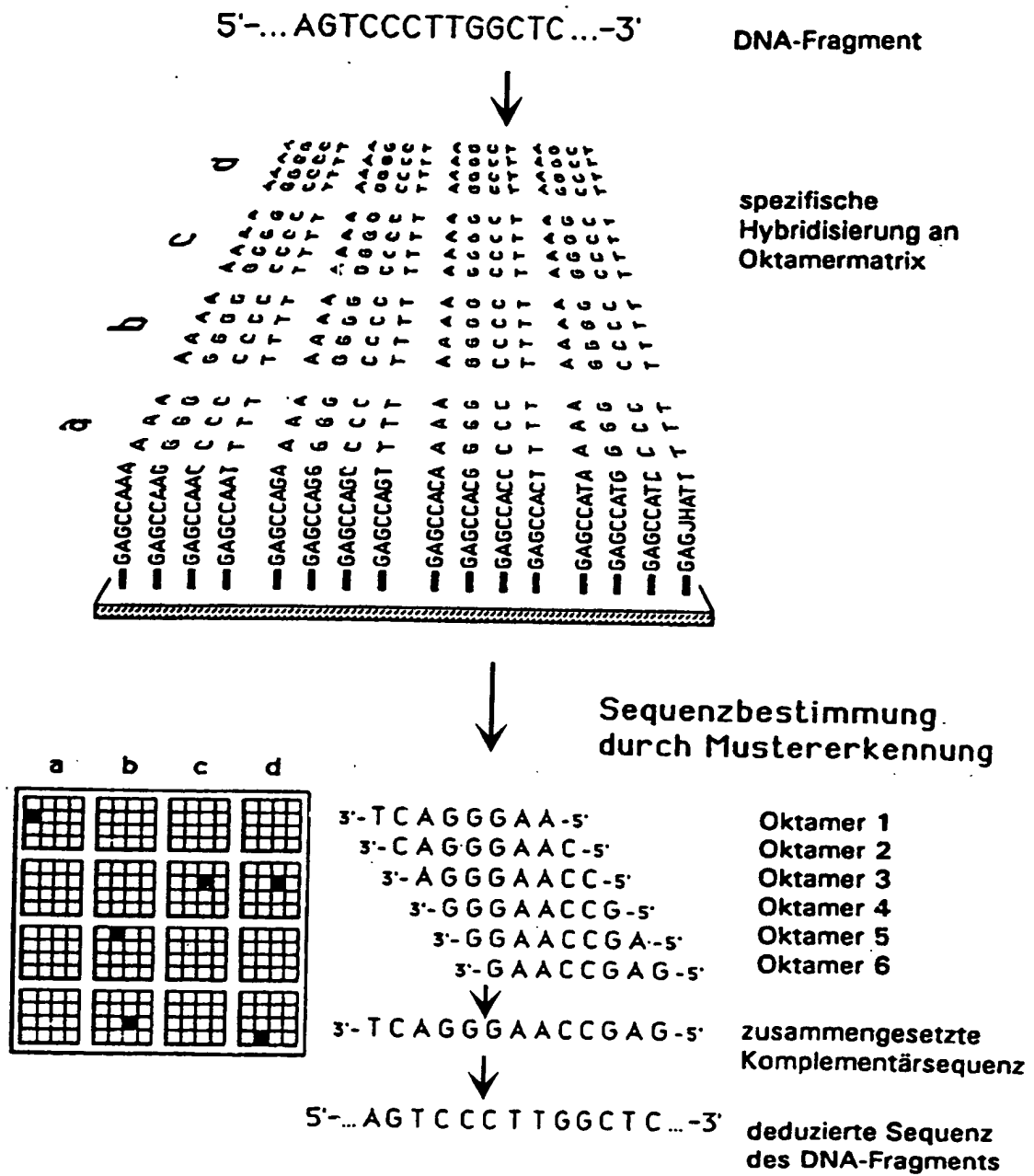
14. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche aus einem Metall oder einer Metallegierung besteht.
15. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche aus einem Halbleiter besteht.
16. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche aus einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 14 und 16, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 13 und 15, einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 15 und 16, oder einer binären Verbindung der Elemente der Gruppen 11 und 17 besteht.
17. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche aus einer ternären Verbindung der Elemente der Gruppen 11, 13 und 16 oder einer ternären Verbindung der Elemente der Gruppen 12, 13 und 16 besteht.
18. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach den Ansprüchen 13 - 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Anbindung der modifizierten Nukleinsäure-Oligomere an die leitfähige Oberfläche kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption erfolgt.
19. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 13 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass alternativ eine der Phosphorsäure-, Carbonsäure-, Amin- oder eine Zucker-Gruppe des Nukleinsäure-Oligomer-Rückgrats kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption an die leitfähige Oberfläche angebunden ist.
20. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 13 - 18, dadurch gekennzeichnet, dass alternativ eine Thiol-, Hydroxy-, Carbonsäure- oder Amin-Gruppe einer modifizierten Base des Nukleinsäure-Oligomers kovalent oder durch Chemi- bzw. Physisorption an die leitfähige Oberfläche angebunden ist.
21. Modifizierte leitfähige Oberfläche nach einem der Ansprüche 13 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils ausschließlich eine Art von modifizierten

Nukleinsäure-Oligomeren in einem räumlich begrenzten Bereich der leitfähigen Oberfläche angebunden ist.

22. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche wie in den Ansprüchen 13 - 21 definiert, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arten von modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren auf eine leitfähige Oberfläche aufgebracht werden.
23. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche wie in den Ansprüchen 13 - 21 definiert, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arten von Nukleinsäure-Oligomeren auf eine leitfähige Oberfläche aufgebracht werden und anschließend eine Modifikation der Nukleinsäure-Oligomere durch ein Verfahren gemäß den Ansprüchen 9 - 12 durchgeführt wird.
24. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure-Oligomere oder die modifizierten Nukleinsäure-Oligomere mit dem dazu jeweils komplementären Nukleinsäure-Oligomerstrang hybridisiert werden und in Form des Doppelstranghybrids auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht werden.
25. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten leitfähigen Oberfläche nach den Ansprüchen 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäure-Oligomer oder das modifizierte Nukleinsäure-Oligomer in Gegenwart von weiteren chemischen Verbindungen, die ebenfalls an die leitfähige Oberfläche angebunden werden, auf die leitfähige Oberfläche aufgebracht wird.
26. Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Oligomer-Hybridisierungsereignissen, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere modifizierte leitfähige Oberflächen, wie in den Ansprüchen 13 - 21 definiert, mit Nukleinsäure-Oligomeren in Kontakt gebracht werden und anschließend eine Detektion der elektrischen Kommunikation zwischen der katalytisch redoxaktiven Einheit und der jeweiligen leitfähigen Oberfläche erfolgt.

27. Verfahren nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion cyclovoltametrisch, amperometrisch, potentiometrisch oder durch Leitfähigkeitsmessung erfolgt.
28. Verfahren zur elektrochemischen Detektion nach den Ansprüchen 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, dass die elektrochemische Detektion durch Zugabe des Substrats zu der über ein Nukleinsäure-Oligomer an die leitfähige Oberfläche angebundenen katalytisch redoxaktive Einheit gestartet wird.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe des Substrats zu der über ein Nukleinsäure-Oligomer an die leitfähige Oberfläche angebundenen katalytisch redoxaktive Einheit auf einen Bereich der leitfähigen Oberfläche mit einer oder mehreren modifizierten Nukleinsäure-Oligomeren-Arten begrenzt wird.

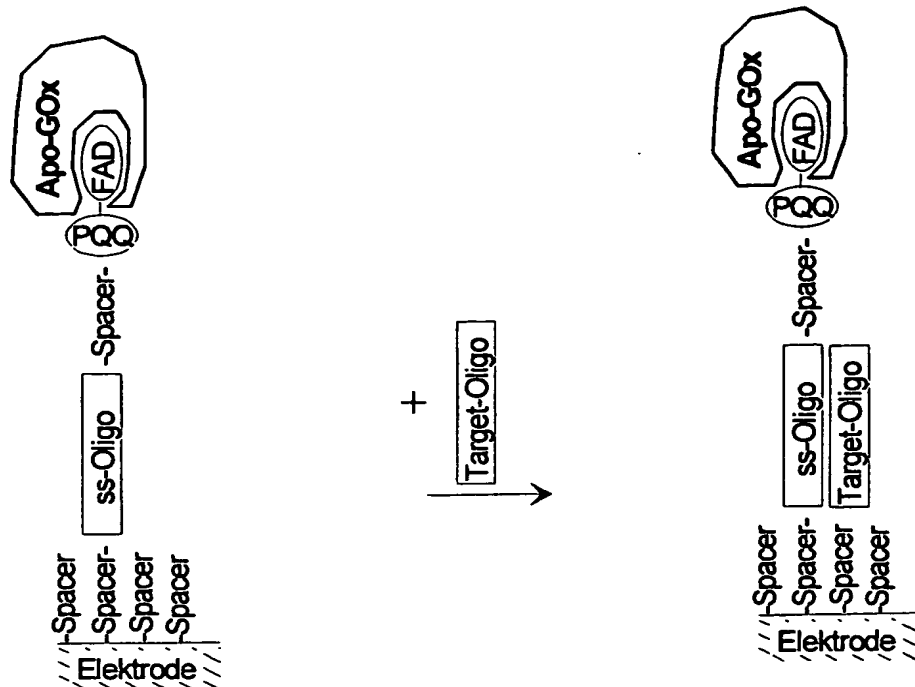
Figur 1



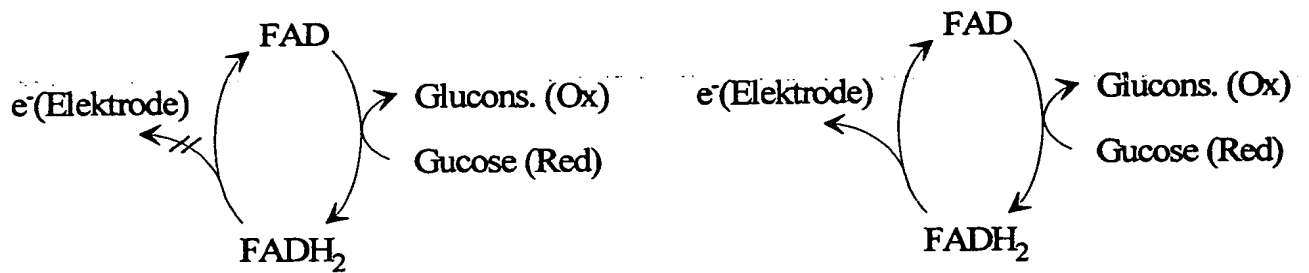
"1"



Figur 3a



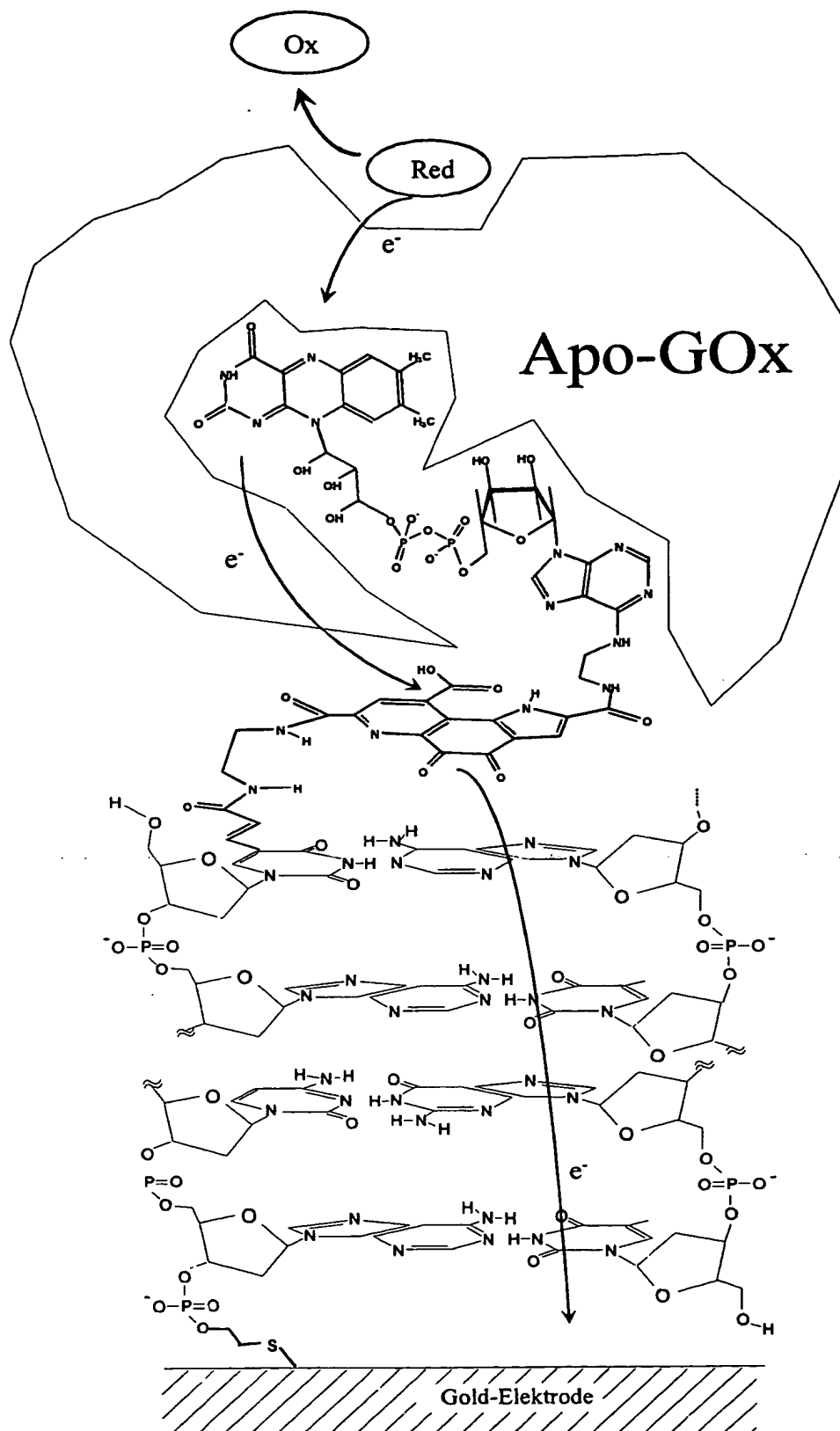
Figur 3b



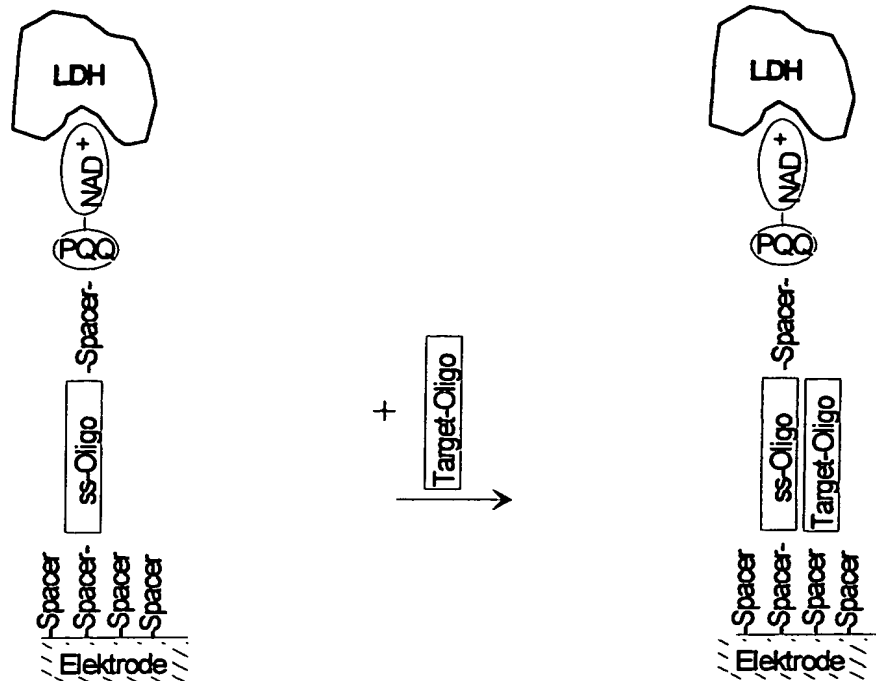
Figur 3c



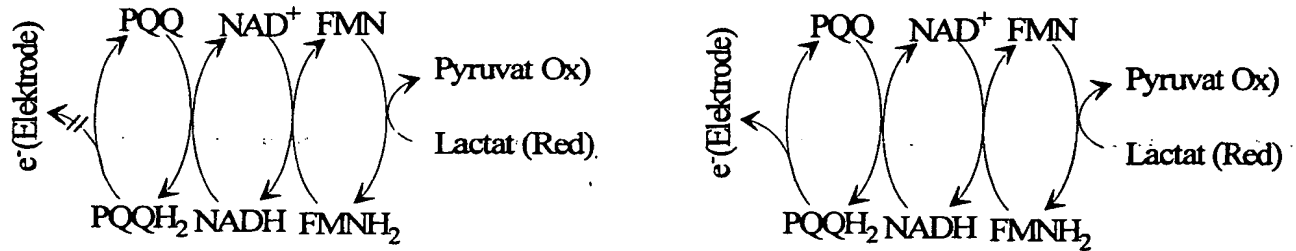
Figur 4



Figur 5a



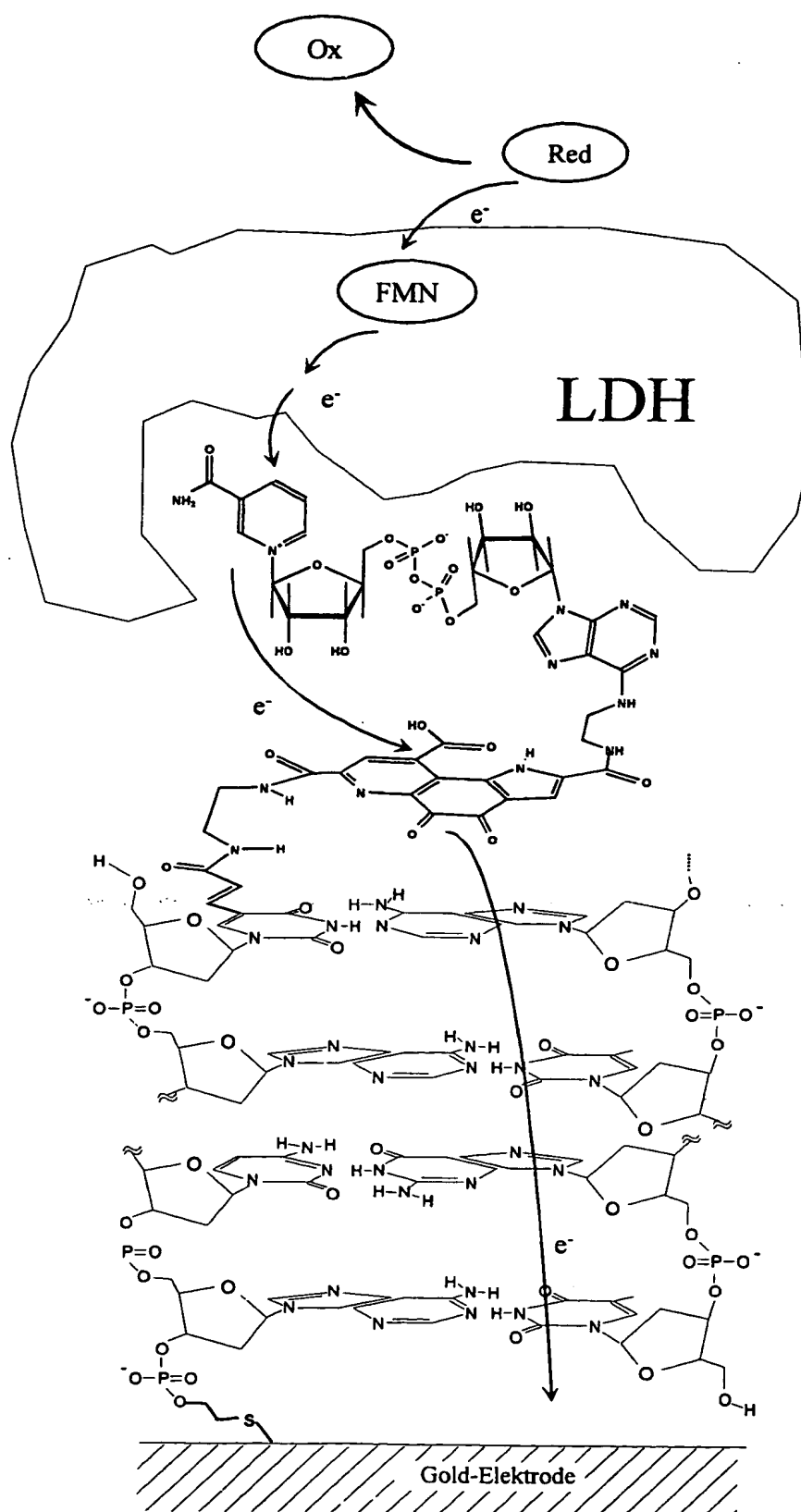
Figur 5b



Figur 5c



Figur 6



Figur 7

